

①日本国特許庁(JP)

①特許出願公表

## ②公表特許公報(A)

平4-505763

③Int.CL<sup>1</sup>  
C 07 K 1/04  
17/08  
G 01 N 39/58試別記号  
D序内整理番号  
8918-4H  
7731-4H  
8310-2J\*審査請求有  
予備審査請求有

部門(区分) 3(2)

(全25頁)

④公表 平成4年(1992)10月8日

⑤発明の名称 非常に大規模な固定化ペプチド合成

⑥特 願 平2-508066  
⑦出 願 平2(1990)6月7日

⑧要文提出日 平3(1991)12月7日

⑨国際出願 PCT/NL90/00081

⑩国際公報番号 WO90/15070

⑪国際公開日 平2(1990)12月13日

優先権主張 ⑫1989年6月7日米国(US)⑬0362,901

⑭発明者 バイアリング、マイケル シー。 アメリカ合衆国、ノース キャロライナ 27707, ダーラム, コットンウッド 3421

⑮出願人 アフィマツクス テクノロジーズ オランダ領アンタイル, キュラコ, デ リユイデルカデ 82 ナームロゼ ベノートスハツブ

⑯代理人 齋木 聰 外4名 AT, AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BF(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CA, CF

⑰指定国 (広域特許), CG(広域特許), CH, CH(広域特許), CM(広域特許), DE, DE(広域特許), DK, DK(広域特許), ES, ES(広域特許), FI, FR(広域特許), CA(広域特許), GB, GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR, LK, LU, LU(広域特許), MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL, NL(広域特許), NO, RO, SD, SE, SE(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許)

最終頁に続く

## 請求の範囲

1. 基体上で配列を製造する方法であって、  
a) 前記基体の第一領域をアクチベーターに曝露することにより保護基を除去する；  
b) 少なくとも前記第一領域を第一モノマーに曝露する；  
c) 第二領域をアクチベーターに曝露することにより保護基を除去する；及び  
d) 少なくとも前記第一領域を第二モノマーに曝露する；  
段階を含んで成る方法。
2. アクチベーターに曝露する前記段階が、イオンビーム、電子ビーム、 $\gamma$ -線、 $\alpha$ -線、電子線照射、光、赤外線照射、マイクロウエーブ、電気、ラジオ波、及びこれらの組合せから成る群から選択されたアクチベーターを使用する、請求項1に記載の方法。
3. 前記保護基が遮光性保護基である、請求項1に記載の方法。
4. アクチベーターに曝露する前記段階が前記基体の既にされた領域に光を適用する段階である、請求項1に記載の方法。
5. 前記第一モノマー及び第二モノマーがアミノ酸である、請求項1に記載の方法。
6. 前記基体上の配列を受容体との親和性についてスクリーニングする段階をさらに含み、このスクリーニング段階が前記基体を前記受容体に曝露しそして前記第一領域及び第二

領域中の保護基の存在について試験する段階をさらに含んで成る、請求項1に記載の方法。

7. 前記受容体が液体である、請求項6に記載の方法。
8. 前記基体が、集合したラングミア・プロジェクト(ショカウドウ フィードミル)フィルム、可溶化されたガラス、ゲルマニウム、シリコン、ポリマー、(ポリ)テトラフルオロエチレン、ポリスチレン、低化ガリウム、及びこれらの組合せから成る群から選択されたものである、請求項1に記載の方法。

9. 前記保護基がオルト-ニトロベンジル保護基、6-ニトロペラトリルオキシカルボニル、2-ニトロベンジルオキシカルボニル、シンチモイル保護基、及びこれらの混合物から成る群から選択されたものである、請求項1に記載の方法。

10. 前記第一領域及び第二領域の各々が $1\text{cm}^2$ と $1.0\text{cm}^2$ との間の全面積を有する、請求項1に記載の方法。

11. 前記第一領域及び第二領域の各々が約 $1\text{cm}^2$ と $1.0\text{cm}^2$ との間の全面積を有する、請求項1に記載の方法。

12. 前記光が単色干涉性光である、請求項4に記載の方法。

13. アクチベーターに曝露する前記段階が前記基体に接着した溶液と共に行われる、請求項1に記載の方法。

14. 前記溶液がさらに前記第一モノマー及び第二モノマーを含んで成る、請求項13に記載の方法。

15. 前記受容体が更に放射性標識及び蛍光標識から成る群から選択された標識を含んで成り、そして受容体の存在を

## 特表平4-505763 (2)

試験する前記段階が前記段階を被覆する段階である、請求項6に記載の方法。

16. アクチベーターに暴露する前記段階が、  
a) ある波長の光に対して実質的に透過性の領域及び反射的で不透過程性の領域を有するマスクを前記基体に接続して置く；並びに  
b) 少なくとも前記段長の光を生成する光源により前記マスクを固明する；

段階を更に含んで成る、請求項1に記載の方法。

17. 前記基体上で10°又はこれより多くの異なる配列を合成するように前記段階が反復される、請求項1に記載の方法。

18. 前記基体上で10°又はこれより多くの異なる配列を合成するように前記段階が反復される、請求項1に記載の方法。

19. 少なくとも第一モノマー及び第二モノマーを含んで成る複数の化学配列を合成する方法であって、

a) 少なくとも第一領域及び第二領域（該第一領域及び第二領域は基体保護基を含んで成る）を有する基体上の第一領域において、該第一領域を活性化することにより該第一領域中の前記基体保護基を除去する；

b) 前記第一モノマーを前記基体に暴露し、該第一モノマーは更に第一モノマー保護基を含んで成り、該第一モノマーは前記第一領域において結合する；

c) 前記第二領域を活性化することにより該第二領域中の

前記基体保護基を活性化する；

d) 前記第二モノマーを前記基体に暴露し、該第二モノマーは更に第二モノマー保護基を含んで成り、該第二モノマーは前記第二領域において結合する；

e) 前記第一領域を活性化することにより前記第一モノマー保護基を除去する；

f) 第三モノマーを前記基体に暴露し、該第三モノマーは前記第一領域において結合して第一配列を生成する；

g) 前記第二モノマーを活性化することにより前記第二モノマー保護基を除去する；並びに

h) 第四モノマーを前記基体に暴露し、該第四モノマーは前記第二領域において結合して第二配列を生成し、該第二配列は前記第一配列と異なる；

段階を含んで成る方法。

20. 少なくとも第一モノマー及び第二モノマーを含んで成る複数の化学配列を合成する方法であって、

a) 少なくとも第一領域及び第二領域を有する基体上で該第一領域を不透過程性化することにより該第一領域中に第一保護基を提供する；

b) 前記第一モノマーを前記基体に暴露し、該第一モノマーは前記第二領域において結合する；

c) 前記第一領域中の前記保護基を除去する；

d) 前記第二領域を不透過程性化することにより該第二領域中に第二保護基を提供する；

e) 前記第二モノマーを前記基体に暴露し、該第二モノマー

ーは前記第一領域において結合する；

f) 前記第二領域中の前記保護基を除去する；

g) 前記第一領域を不透過程性化することにより該第一領域中に保護基を提供する；

h) 第三モノマーを前記基体に暴露し、該第三モノマーは前記第二領域において結合して第一配列を生成する；

i) 前記第一領域中の前記保護基を除去する；

j) 第四モノマーを前記基体に暴露し、該第四モノマーは前記第一領域において結合して第二配列を生成し、該第二配列は前記第一配列と異なる；

段階を含んで成る方法。

21. 基体上で少なくとも第一ポリマー配列及び第二ポリマー配列を合成する方法であって、該第一ポリマー配列は該第二ポリマー配列とは異なるモノマー配列を有し、

a) 前記基体とエネルギー源との間に第一マスクを挿入し、該マスクは第一領域及び第二領域を有し、該第一領域は前記エネルギー源からのエネルギーの透過を許容し、該第二領域は前記エネルギー源からのエネルギーを遮断する；

b) 前記エネルギー源からのエネルギーを前記第一マスクの前記第一領域下の前記第一ポリマーの第一部から保護基を除去する；

c) 前記第一ポリマーの第二領域を前記基体に暴露することにより第一ポリマー配列を生成せしめる；

d) 前記基体と前記エネルギー源との間に第二マスクを挿入し、該第二マスクは第一領域及び第二領域を有する；

e) 前記エネルギー源からのエネルギーを前記基体に向け、該エネルギーが前記第二ポリマーの第一部から前記第二マスクの前記第一領域下の前記保護基を除去する；並びに

f) 前記第二ポリマーの第二部分を前記基体に暴露し、該第二ポリマーの第二部分が該第二ポリマーの前記第一部と結合して第二ポリマー配列を生成せしめる；

段階を含んで成る方法。

22. 受容体との結合について複数のアミノ酸配列をストライニングする方法であって、

a) 少なくとも第一表面（該少なくとも第一表面はニトロペラトリルオキシカルボニル及びニトロベンジルオキシカルボニルから成る群から選択された先保護材料を含んで成る）を有するガラス板上で、前記少なくとも第一表面を貯蔵のために：一ブロトキシカルボニルと反応せしめ、前記ガラス板は少なくとも紫外光に対して実質的に透過性である；

b) 前記少なくとも第一表面をTFAに暴露することにより前記レブロトキシカルボニルを除去する；

c) 前記ガラス板を反応面上に置き、該反応器は反応空間を含んで成り、前記少なくとも第一表面が該反応空間に暴露される；

d) 前記ガラス板の第一位置にマスクを置き、該マスクは第一場所及び第二場所を含んで成り、該第一場所は少なくとも紫外光に対して実質的に透過性でありそして該第二場所は少なくとも紫外光に対して実質的に不透過性であり、該第二場所は前記マスクの第一表面上の先遮断材料を含んで成り、

## 特表平4-505763 (3)

がマスクの核第一表面は前記ガラス板と接触する；

e) 前記反応空間を反応容器で充たす；

f) 前記マスクを少なくとも紫外光により照射し、該紫外光が前記マスクの面第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

g) 前記第一表面を第一アミノ酸に曝露し、該第一アミノ酸は少なくとも第一表面の前記光保護材料が除去された領域に結合し、該第一アミノ酸はその末端に前記光保護基を含んで成る；

h) マスクを前記ガラス板と第二位置において接触せしめる；

i) 前記マスクを少なくとも紫外光により照射し、該紫外光が前記マスクの第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

j) 前記少なくとも第一表面を第二アミノ酸に曝露し、該第二アミノ酸は少なくとも第一表面の前記光保護材料が除去された領域に結合し、該第二アミノ酸はその末端に前記光保護基を含んで成る；

k) マスクを前記ガラス板と第三位置において接触せしめる；

l) 前記マスクを少なくとも紫外光により照射し、該紫外光が前記マスクの面第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

m) 前記少なくとも第一表面を第三アミノ酸に曝露し、該第三アミノ酸は少なくとも第一表面の前記光保護材料が除去された領域に結合し、該第三アミノ酸はその末端に前記光保護基を含んで成る；

安された領域に結合する；

n) マスクを前記ガラス板と第四位置において接触せしめる；

o) 前記マスクを少なくとも紫外光により照射し、該紫外光が前記マスクの面第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

p) 前記少なくとも第一表面を第四アミノ酸に曝露し、該第四アミノ酸は少なくとも第一表面の前記光保護材料が除去された領域に結合し、少なくとも第一表面は少なくとも第一、第二、第三、及び第四アミノ酸配列を含んで成る；

q) 前記少なくとも第一表面を他の液体に曝露し、該液体の液体が前記第一、第二、第三又は第四アミノ酸配列の少なくとも1つにより強く結合する；

r) 前記少なくとも第一表面を受容体に曝露し、該受容体は前記他の液体を認識しそしてその複数の場所において結合し、該受容体はフルオレッセインを含んで成る；

s) 前記少なくとも第一表面に光を暴露し、該第一表面は少なくとも前記より強く結合したアミノ酸配列が位置する領域において蛍光を発する；及び

t) 前記少なくとも第一表面を横切る場所に割れとして微小の裂隙を検出及び記録する；

段階を含んで成る方法。

2.3. 受容体との結合について少なくとも1つのペプチド配列を固定する方法であって、

s) 各々が光吸収可能な保護基を有する複数のガリバペチ

Fを有する基体上で、第一の基体されたガリバペチドを留計することによって前記保護基を除去する；

b) 前記ガリバペチドを第一アミノ酸と接触せしめることにより第一配列を生成せしめ、前記基体上の第二ガリバペチドは第二配列を含んで成る；及び

c) 前記第一配列又は第二配列のいずれか前記受容体と結合するかを同定する；

段階を含んで成る方法。

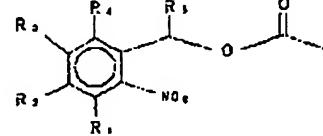
2.4. 複数のポリマーを製造するための装置であって、

a) エネルギー源への曝露に際して活性化されてモノマーと反応する反応性部分を含んで成る表面を有する基体；及び

b) 前記表面の部分を前記エネルギー源から選択的に保護及び曝露するための手段；

を含んで成る装置。

2.5. 前記反応性部分が更に保護基を含んで成り、該保護基が次の式：



(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>はアルコキシ、アルキル、ハロゲン、アリール、アルケニル又は水素であり；R<sub>3</sub>はアルコキシ、アルキル、ハロゲン、アリール、ニトロ又は水素であり；R<sub>4</sub>はアルコキシ、アルキル、ハロゲン、ニトロ、アリール又は水素であ

り；R<sub>1</sub>はアルコキシ、アルキル、アリール、ハロゲン又はニトロであり；R<sub>2</sub>はアルキル、アルキニル、シアノ、アルコキシ、水素、ハロゲン、アリール又はアルケニルである)で表わされる、請求項2.4に記載の装置。

2.6. 前記反応性部分が更にリンカー分子を含んで成る、請求項2.4に記載の装置。

2.7. 前記リンカー分子がエチレンジリコールオリゴマー、ジアミン、二酸、アミノ酸、及びこれらの組合せから成る群から選択されたものである、請求項2.6に記載の装置。

2.8. 選択的保護のための前記手段がさらにマスクを含んで成る、請求項2.4に記載の装置。

2.9. 前記選択的保護のための前記手段が更に光バルブを含んで成る、請求項2.4に記載の装置。

2.10. 前記エネルギー源が光源である、請求項2.4に記載の装置。

2.11. 前記反応性部分が更に、ニトロペラトリルオキシカルボニル、エトセベシジルオキシカルボニル、ジメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル、5-ブロモ-2-ニトロイソブリニル、ヒドロキシ-2-メチルシンナモイル、及び2-オキシシチレンアンスラキノンから成る群から選択された組成物を含んで成る、請求項2.4に記載の装置。

2.12. その上に複数のアミノ酸配列を有する基体の製造のための装置であって、

a) 表面を有する基体；

b) 光、電子ビーム及びX-線放射から成る群から選択さ

れたエネルギー源への最終の際に除去され得る、前記表面上の保護基：

c) 前記表面上の選択された場所に前記エネルギー源を向けるための手段：並びに

d) 前記表面への結合のために該表面にアミノ酸を導入するための手段：

を含んで成る装置。

33. 表面を有する基体を含んで成るポリマーをスクリーニングするための装置であって、該表面は少なくとも2種のあらかじめ定められた領域を含んで成り、該あらかじめ定められた領域はその上に異なるモノマー配列を含み、該あらかじめ定められた領域の各々が約0.1～0.5未満の面積を占めることを特徴とする装置。

34. 前記面積が約0.01～0.1未満である、請求項33に記載の装置。

35. 前記面積が10000μ<sup>2</sup>未満である、請求項33に記載の装置。

36. 前記面積が100μ<sup>2</sup>未満である、請求項33に記載の装置。

37. 前記モノマー配列が前記あらかじめ定められた領域内で実質的に純粋である、請求項33、34、35又は36に記載の装置。

38. その表面のあらかじめ定められた領域に10°又はそれより多くの異なるリガンドを含んで成る、生物学的活性についてスクリーニングするための基体。

#### 特表平4-505763 (4)

39. 前記基体があらかじめ定められた領域内に10°又はそれより多くの異なるリガンドを含んで成る、請求項38に記載の基体。

40. 前記基体があらかじめ定められた領域内に10°又はそれより多くの異なるリガンドを含んで成る、請求項38に記載の基体。

41. 前記基体があらかじめ定められた領域内に10°又はそれより多くのリガンドを含んで成る、請求項38に記載の基体。

42. 前記リガンドがペプチドである、請求項38、39、40又は41に記載の基体。

43. 前記リガンドが前記あらかじめ定められた領域内で実質的に純粋である、請求項33に記載の基体。

44. 生物学的活性についてスクリーニングするための装置であって、

a) 構成のポリマー配列を含んで成る基体（該ポリマー配列は該基体上の既知の場所において該基体の表面に結合されており、該配列の各々は約0.1～0.5未満の面積を占めている）；

b) 蛍光標識により保護されており前記配列の少なくとも1つと結合する受容体に前記基体と結合する手段：並びに

c) 前記基体上の前記蛍光標識の場所を被覆するための手段：

を含んで成る装置。

45. 構成のポリマーを形成するための装置であって、

a) 少なくとも第一表面と光触起可能な保護材料を含んで

成る第二表面とを有し、且つ少なくとも第一の表面の光に対して実質的に透過性である基体；

b) その内の反応液体空間と共に配置表面を有する反応器体（前記第二表面が該配置表面と密封関係に維持される）；並びに

c) 前記基体の表面に向けられる、少なくとも前記の第一表面の光を発生するための光線；

を含んで成る装置。

46. 基体上の蛍光標識された領域を検出するための装置であって、

a) 前記基体の表面に光をむけるための光源；

b) 前記光源に応答して前記表面から発生した蛍光を検出する手段；

c) 前記各体を第一位置から第二位置に移行するための手段：並びに

d) 前記基体上の場所の間数として蛍光強度を基準するための、前記移行手段及び前記検出手段に連絡された手段；を含んで成る装置。

#### 明細書

##### 序文に大規模な固定化ペプチド合成

##### 著作権告知

本特許文書の一部は著作権保護にゆだねられる内容を含む。本著作権者は本特許文書又に特許顯示が米国特許商標庁の特許文書中に存在する時いずれの者による複数筋生に対しても異存はないが、その他の場合はいかなる場合もすべての著作権を留保する。

##### 発明の背景

本発明は既知の場所における物質の合成及び配置に関する。特に、本発明の1つの般は第一基体表面上の既知の場所における複数の化学配列の製造のための方法及び関連する装置を提供する。本発明は例えばオリゴマー、ペプチド、核酸、オリゴツカライド、ホスホリビド、ポリマースは還元同類物質の製造の分野において、特に生物学的活性についてのスクリーニングにおいて使用するための化学的多様性の概念を創製するための選択され得る。

構造と分子の活性との関係は生物学的系の研究における基本的な事項である。構造-活性関係は細胞の膜、細胞が相互に連絡し合う方法、並びに細胞内膜及びフィードバック系を運営するためには重要である。

ある種の巨大分子が、非常に特徴的な三次元空間的及び電

子的分布を有する他の分子と相互作用しそして結合することが知られている。この様な特異性を有するすべての大分子は、それが代謝中固有の加水分解を触媒する酵素であるか、イオンの親和性を中介する荷電表面蛋白質であるか、近傍の細胞に対して肯定の細胞を同定するのに役立つ細蛋白質であるか、血漿中で循環している Ig G-クラス抗体であるか、膜内のDNAのオリゴヌクレオチド配列であるか等に拘らず、受容体 (receptor) と考えることができる。受容体が選択的に結合する種々の分子はリガンド (ligand) として知られる。

既知の受容体及びリガンドの結合親和性を測定するために多くの測定方法が利用可能であるが、この様な実験から得られる情報は利用可能なリガンドの数及びタイプによりしばしば制限される。既知のリガンドは時として、偶然に、又はX-線結晶分析及び蛋白質のための透析子組換技術を含めて、分子構造の解明のための新たな技術の適用により発見される。

小ペプチドは構造と生物学的機能との間の関連性を探索するための指示的系である。ペプチドはアミノ酸の配列である。20種類の天然アミノ酸がポリマー分子に結合されるとき、それらは広範囲の種類の三次元構造を形成し、それぞれは既定のアミノ酸配列及び溶剤条件に基く。50種類の天然アミノ酸の可能なペプチドの数は、例えば2<sup>20</sup>又は3.2×10<sup>30</sup>の異なるペプチドである。このサイズの分子が受容体結合研究において有用であるらしいことは、幾つかの論文が既知のアミノ酸という短い配列を高い特異性をもって

#### 特表平4-505763 (6)

認証することを示すエピトープ分析研究により支持される。さらに、アミノ酸の平均分子量は小ペプチドを、多くの現在实用的な医薬製剤のサイズ範囲に近く。

医薬の発見は、項述一概説開拓のこの様な研究に類する研究の1つのタイプである。ほとんどの場合、生物学的に重要な受容体に対する特異性の至ましいパターンを有する新規なリガンドを発見する過程として、同時代的医薬研究を記載することができる。尚の如く、農薬において使用するための新規な化合物、例えば除虫剤及び除草剤を発見するための研究である。

時として、リガンドを設計するための合意的な工程の解決は困難であり又は彈力性に欠けるものである。多数の異なるポリマーを調査するための従来の方法は、効率的で合理的な又はランダムなスクリーニングを可能にするのに十分な規模で用いられる場合、骨が折れるほど遅かった。例えば、固体支持基上でのペプチドの合成のためにメリフィールド (Merifield) 法 (J. Am. Chem. Soc. (1963) 85: 2149-2154) が使用されている。メリフィールド法においてはアミノ酸が不溶性ポリマーから作られた支持体に共有結合される。同一保護基を有する他のアミノ酸が、前記共結合したアミノ酸と反応してジペプチドを形成する。洗浄の後、保護基が除去され、そして同一保護基を有する第三のアミノ酸が次のジペプチドに加えられる。この工程は、希望の長さ及び配列のペプチドが得られるまで繰り返される。メリフィールド法を用いる場合、1日に百を越えるペプチド配列を合成することは極めて可能である。

#### 発明の概要

種々のポリマーの合成のための改良された方法及び装置が開示される。

1つの好ましい構成においては、リンカー分子が基体上に与えられる。このリンカー分子の一端には、光感受可能な (photoremoveable) 保護基により保護された光感受官能基が設けられる。リソグラフ (lithography) 法を用いて、第一の選択された領域において、光感受可能な保護基が光に曝露されそしてリンカー分子から除去される。次に基体を洗浄し、又は第一モノマーと接触せしめる。この第一モノマーはリンカー分子上の露出された官能基と反応する。好ましい構成においては、モノマーはそのアミノ酸又はカルボキシ酸基に光感受可能な保護基を含むアミノ酸であり、そしてリンカー分子は光感受可能な保護基を有するアミノ基又はカルボキシ酸基を末端として有する。

次に、第二セットの選択された領域を光に曝露し、そしてリンカー分子/保護されたアミノ酸上の光感受可能な保護基を第二セットの領域において除去する。次に、基体を、暴落された官能基との反応のために光感受可能な保護基を有する第二モノマーと接触せしめる。希望の長さ及び希望の化学配列を有するポリマーが得られるまで選択的にモノマーを適用するためにその工程を反復する。次に、光感受性基を場合によっては除去し、そして次に配列を場合によってはキャップする。個別保護基が存在する場合はそれらも除去される。

本明細書に開示するリソグラフ法を用いることにより、基

本的に実際的ではない。

より多数のポリマー配列を合成するため、ポリマー合成のための一連の反応装置を使用することも盛んされている。例えば、試験の自動化された逐次的付加により固相支持体上で直鎖状ポリマーを合成するためにチープな反応系を用いることができる。この方法はなお、効果的で経済的なスクリーニングのために十分なだけ多数のポリマー配列の合成を可能にしない。

多数の配列を調製するための方針が既に知られており、この方法においては孔状 (foraminal) 器器が既知の反応性の多孔性粒子を封入しており、この粒子は容器の孔より大きなサイズを有する。この容器は所定の材料と選択的に対応して生合成分子の所望の配列を合成することができる。多孔性において知られている他の方法の場合と同様に、この方法は、効率的なスクリーニングのために十分に多様なペプチドを合成するために特に用いることができる。

他の技術も記載されている。これらの方針には、選択的マイクロタイマーレートの方式に合致する96個のプラスチックピン上でのペプチドの合成が含まれる。不適合なことは、これらの技術はある程度有用ではあるが実質的な問題点が残ったままである。例えば、これらの方法は、経済的に合成でき、またスクリーニングすることができる配列の多様性において制限されたままである。

以上のことから、知られた場所において種々の化学的配列を合成するための改良された方法及び装置が求められている。

## 特許平4-505763(6)

体上の相対的に小さな且つ正確に知られた場所に光を向けることが可能である。従って、基体上の知られた場所において知られた化学配列のポリマーを合成することが可能である。

得られる基体は、例えば生物学的用途について多数のポリマーをスクリーニングすることを含めて種々の用途を有するであろう。生物学的活性をスクリーニングするためには、基体を又は複数の受容体、例えば抗体、全細胞、小胞上の受容体、脂質、又は他の種々の受容体のいずれかに曝露する。受容体は好ましくは例えば蛍光標識、放射能標識、又は受容体と反応性の標識された抗体により標識される。基体上の標識の位置は例えば光子検出法又はオートラジオグラフィー法により検出される。結合が検出される位置における物質の配列の知識を通して、どの配列が受容体を結合するかを迅速に決定することができ、そしてそれ故にこの技術を用いて多数のペグチドをスクリーニングすることができる。本発明の他の可能な用途には診断が含まれ、この場合、特定の受容体に対する種々の抗体が基体上に置かれ、そして例えば血液が免疫不全についてスクリーニングされるであろう。更なる用途には、例えば、半導体装置における有機物質の選択的「ドーピング」(doping)等が含まれる。

本発明の1つの要点に關して、ポリマーを合成するための選択された反応器系も開示される。この反応器系は、周辺部で基体と適合する基体台を含む。この基体台は基体と適合との間に反応器空間を備えており、それを通して又はその中に反応液体がポンプ導送され又は流れ、反応器空間中の基

体の選択された領域を膜保護するように、基体上にマスクが置かれ又は集中され、そして照明される。モノマーが反応器空間を通過するポンプ導送され又は基体と接触され、そして膜保護された領域と反応する。基体上の領域を選択的に膜保護し、そして反応空間を遮して所定のモノマーを選すことにより、知られた場所において所望のポリマーを合成することができる。

改良された検出装置及び方法も開示される。この検出方法及び装置は、基体の表面上の知られた位置に非常に多様なポリマー配列を有する基体を用いる。基体は蛍光標識された受容体に曝露され、該受容体は又は標識のポリマー配列と結合する。基体は、結合が起った位置の特定のために蛍光検出装置内に置かれる。この蛍光検出装置は基体に光を向けるための多色光源又は多色光強、基体からの蛍光を検出するための手段、及び蛍光の場所を決定するための手段を含む。基体上の蛍光を検出するための手段は複数の手段においては光子カウンターを含むであろう。蛍光の位置を決定するための手段は基体のためのエノック動 (エレキシオド) を含むであろう。スライドの移動及びデーターの収集は適切にプログラムされたデジタルコンピューターにより記録されそして受達される。

本発明の性質及び利点の更なる理解は本明細書の残りの部分及び添付された図面への言及により実現されるであろう。

## 特許の簡単な説明

図1は、第一場所における基体のマスク及び照射を示す。  
基体は断面として示されており；  
図2は、モノマー「A」の適用後の基体を示す；  
図3は、第二場所における基体の回転を示す；  
図4は、モノマー「B」の適用後の基体を示す；  
図5は、「A」モノマーの照射を示す；  
図6は、「B」の第二の適用後の基体を示す；  
図7は、完成された基体を示す；  
図8A及び8Bは、基体上の複数のポリマーを形成するための反応器系のいずれか選択可能な具体例を示す；  
図9は、基体上の蛍光標識の位置を決定するための検出装置を示す；  
図10A～10Mは、モノマー「A」及び「B」のトリマーの構造に適用される場合の方法を示す；  
図11A、11B及び11Cは、標準的蛍光ビーズについての蛍光強度であり；  
図12A及び12Bは、それぞれ、光に暴漏されていないNVOCスライド及び光に暴露されたNVOCスライドについての蛍光強度であり；  
図13A及び13Bは、標識されたHerrington抗体に暴露されたYGGFL及びGGFLのチエンカーボードパターンを有するスライドの構造を示す；そして  
図14A及び14Bは、2個の異なるガラススライド上で合成された16の配列のマッピングを示す。

## 特許の詳細な説明

## 四 次

I. 用語集  
II. 一般  
III. ポリマー合成  
IV. 反応器系の1種類の詳細  
V. 蛍光検出装置の1種類の詳細  
VI. 受容体の相対結合強度の決定  
VII. 実施例  
A. スライドの調製  
B. 「A」及び「B」の各種のトリマーの合成  
C. アミノ保護基及び蛍光基のダイマーの合成  
D. シグナルの可視性の確認  
E. 単位面積あたり分子の数の証明  
F. NVOCの除去及び蛍光標識の付加  
G. NVOCの除去におけるマスクの使用  
H. YGGFLの付加並びにこれに続くHerrington抗体及びヤギ抗マウスへの暴漏  
I. YGGFLのモノマー並列合成及びそれに続く標識された抗体への暴漏  
J. YGGFL及びPGGFLのモノマー並列合成  
K. YGGFL及びYPGFLのモノマー並列合成  
L. 16種類の異なるアミノ酸配列の並列の合成及びHerrington抗体に対する相対結合強度の評価  
M. 具体例の示す

## II. 緒論

## 1. 用語

次の用語は、これらが本明細書において使用される場合、下記の一般的意味を有する。

## 1. 横補的

リガンド分子及びその受容体の相互作用する表面の形態的 (topological) 互換性又は一致性に因する。すなわち、受容体とそのリガンドは相補的であると記述することができ、そしてそれ故にその強度及特徴は相補に相應である。

## 2. エピトープ

抗体として知られる受容体のサブクラスとの相互作用領域により恒定される抗原分子の部分

## 3. リガンド

リガンドは特定の受容体により認識される分子である。本発明により研究され得るリガンドの例には、吸定的ではないが、細胞膜受容体に対するアゴニスト及びアンタゴニスト、毒素 (toxin 及び venom)、ウイルスエピトープ、ホルモン (例えば、鎮静剤、あへん剤、スチロイド等)、ホルモン受容体、ペプチド、酵素、酵素基質、錯因子、変物、レクチン、糖、オリゴスクレオチド、核酸、オリゴサッカライド、蛋白質、及びモノクローナル抗体が含まれる。

## 4. モノマー

一時に連結してポリマーを形成することができる小分子のセットの構成質。モノマーのセットは限定的ではないが例え

## 5. 受容体

所与のリガンドに対する親和性を有する分子。受容体は天然分子でも人造分子でもよい。さらに、これらはその変化していない状態又は他の種との複合体として用いることができる。受容体は共有結合により又は非共有結合により、直接に又は特定の結合物質を介して結合質に附加され得る。本発明により使用され得る受容体の例には、固定的ではないが、抗体、細胞膜受容体、特定の疾患決定基 (例えばウイルス、細胞又は他の材料上にあるもの) と反応するモノクローナル抗体及び抗体球、薬物、ポリヌクレオチド、核酸、ペプチド、錯因子、レクチン、糖、ポリサッカライド、細胞、細胞膜、及びオリガノラが含まれる。受容体は時として脂質界において抗-リガンドとも称される。本明細書において受容体なる用語が使用される場合、意味の相違は考慮されない。2つの巨大分子が分子認識を介して結合して複合体を形成する場合、「リガンド受容体対」が形成される。

本発明により研究され得る受容体の他の例には次のものがあるが、これらに限定されない。

## 6. 病生物受容体

病生物の表面に固有な特異的結合蛋白質又は酵素のごとき、受容体に結合するリガンドの決定は新しいクラスの病生物質において有用である。特に価値あるものは、日和見真菌、真菌酵母、及び現在使用されている病生物質に対して耐性を有する細胞に対する抗体剤質であろう。

## 特表平4-505763(7)

ば通常のレーアミノ酸のセット、D-アミノ酸のセット、合成アミノ酸のセット、スクレオチドのセット、並びにペントース及びヘキソースのセットが含まれる。本明細書において使用する場合、モノマーはポリマーの合成のための基本セットのいずれかの構成員に因する。例えば、レーアミノ酸のダイマーはガリベペチドの合成のための 4 つの中ノマーの基本セットを構成する。モノマーの既る基本セットはポリマーの合成における逐次段階で使用されるであろう。

## 7. ペプチド

モノマーがペプチドでありそしてアミド結合を介して一緒に結合しているポリマーであって、ガリベペチドとも称する。この明細書の文脈において、アミノ酸は L-光学異性体又は D-光学異性体であり得る。ペプチドは 2 より多くのアミノ酸モノマーの長さを有し、そしてしばしば 20 より多くのアミノ酸モノマーの長さを有する。アミノ酸のためには標準的略号が用いられる (例えば、アラニンについては A)。これらの略号は Society of Biotechnology, 第 3 版、1988 に含まれており、これをすべての目的のために引用により本明細書に組み入れる。

## 8. 放射

例えば、電子ビーム放射、 $\gamma$ -放射、 $\alpha$ -線放射、微波放射、可視光、赤外線放射、マイクロウェーブ放射及びラジオ波を含むする 10<sup>-14</sup> ノートル及び 10<sup>4</sup> ノートルの間の成長を有するエネルギーを含めて、選択的に適用され得るエネルギー。「照射」とは、表面への放射の適用を意味する。

## 9. 脱離

例えば、神経伝達物質の前駆を担当する酵素のごとき酵素の結合部位: 組み神経伝達物質を酵素化しめる酵素の作用を変更するある種の受容体に結合するリガンドの決定は、神経伝達の不全の治療において使用され得る調節の開発において有用である。

## 10. 抗体

例えば、本発明は、注用の抗原のエピトープと結合する抗体分子上のリガンド結合部位の研究において有用であり、抗原性エピトープを構成する配列の決定はウクチンの開発を導くことができ、複数ウクチンの免疫原は又は複数のこの複数配列に基づき、あるいは前駆決定は生物学的処理において、例えば自己免疫疾患に対して (例えば「自己」抗体の結合をブロックすることにより) 有用な免疫抑制剤又は化合物の開発を導くことができる。

## 11. 遺伝

核酸の配列を含めて DNA 又は RNA 組合配列を樹立することができる。

## 12. 特殊的ポリペプチド

1 又は複数の受容体の 1 又は複数の生成物への結合を含む化学反応を促進することができるポリマー。詳しくはガリベペチド、この複数ポリペプチドは一般に少なくとも 1 つの受容体又は反応中間体に対して特異的な結合部位、及び該結合部位の近くにある活性官能基を含み、この官能基は結合した受容体を化学的に変形することができる。特異的ポリペプチド

## 特表平4-505763 (B)

本発明において用途を有する凝膠体の例にはエトロベータトリルオキシカルボニル (N-1-tro-β-oxycarbonyl)、ニトロベンジルオキシカルボニル、ジメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル、5-ブロモ-2-ニトロイソドリニル、2-ヒドロキシ-2-メチルシンナモイル、及び2-オキシメチレンアンスラキノンが含まれる。アクチベーターの他の例にはイオンビーム、電界、電界、電子ビーム、X-線等が含まれる。

## 10. 所定の領域

所定の領域とは、ポリマーの合成のために活性化されたか、活性化されているか、又は活性化されることが意図される表面の位置決定された領域である。所定の領域は任意の便利な形状、例えば円形、長方形、橢円形、くきびら等を有することができる。本明細書において簡略化のため、「所定の領域」を特として單に「領域」と称する。

## 11. 実質的領域

基体の1つの所定の領域がそれを他の所定の領域から区別する特徴を示す場合、ポリマーは所定の領域内で「実質的領域である」と考えられる。典型的には純度は、均一な配列の結果としての生物学的活性又は機能として測定されるであろう。この様な特徴は典型的には選択されたリガンド又は受容体との結合により測定されるであろう。

## 12. 一般

本発明は、複数の所定の領域に複数のポリマー配列を有する基体の調製及び使用のための方法及び装置を提供する。本

テドは例えば米国特許公報No.404,620に記載されており、これすべての目的のため引用により本明細書に組み入れる。

## 13. ホルムと受容体

例えば、インシュリン及び成長因子のための受容体。高い親和性をもつて受容体に結合するリガンドの決定は、例えば、糖尿病の症状の改善のために糖尿病患者がとらなければならない日常的進行に代る経口投与の開発、及び他の場合、死体から又は組織よりDNA技術によって得ることができる少いヒト成長ホルモン代謝において有用である。他の例は血管収縮ホルモン受容体であり、受容体に結合するリガンドの決定は血圧を制御する薬剤の開発を導くであろう。

## 14. あへん (ココナッツオイル) 受容体

脂におけるあへん受容体に結合するリガンドの決定はソルファン及び間連葉酸の吸収性の少ない代替物の開発において有用である。

## 15. 糖

硬質又は半硬質表面を有する材料。多くの形状例においては基体の少なくとも1つの表面は実質的に平らであるが、幾つかの形状においては、異なるポリマーのための合成領域を例えばウェル、隆起した領域、エッティングされた構造により物理的に分離するのが望ましい。他の具体例に於れば、合成の完了の後に放出される小ピースを表面に備えることができる。

## 16. 医薬品

モノマー系シートに結合しておき、そして電磁波射のごときアクチベーターへの曝露に際して空間的に除去される材料。

発明はこの明細書において主として、アミノ酸の配列を含む分子の調製に関して記載されるが、しかし他のポリマーの調製にも容易に適用することができる。この様なポリマーには、例えば、核酸の複数種及び核酸ポリマー、ポリサッカライド、リン脂質、セー、ヌー又はヒアミノ酸を有するペプチド、上記のいずれかに既知の蛋白質が共有結合しているヘテロポリマー、ポリウシタン、ポリエチル、ポリカーボネート、ポリウレア、ポリアミド、ポリエチレンイミン、ポリアリーレンスルフィド、ポリシロキサン、ポリイミド、ポリアセチート、あるいはこの開示の構成の後に明らかになるであろう他のポリマーが含まれる。好ましい形状において、本発明はペプチドの合成に使用される。

調製された基体は、例えば、受容体との結合のためのリガンドとして種々のポリマーをスクリーニングするのに使用されるが、しかしこの発明はリガンドと結合する受容体の合成のためにも使用することができる。この明細書に開示される基体は、広範な種類の他の用途を有するであろう。舉に何として、本明細書において本発明は蛋白質に結合する核酸配列及びペプチド配列の決定、医療科学的結合領域の発見、抗体により認識されたエピトープの同定、並びに臨床的及び診断的用途並びに上記の組合せのための種々の薬剤の供給において、使用され得る。

本発明は好ましくは、表面を有する基体「S」の使用を提供する。場合によっては基体の表面にリンカー分子「し」が与えられる。幾つかの形状において、リンカーの目的は合成

されたポリマーの受容体認識を促進することである。

場合によっては、リンカー分子は肝臓の目的のために化学的に保護されているてもよい。幾つかの形状においては、B-OC (レーブトキシカルボニル) のごとき化学的保護基を用いることができる。この様な化学的保護基は、例えば酸性溶液への暴露の後に化学的に除去され、そして肝臓の間に保護するためには独立してポリマーの構造に先立って除去されるであろう。

基体又はリンカー分子の遠赤外線に保護基Pを有する官能基が与えられる。保護基Pを放射、電界、電流又は他のアクチベーターへの曝露に際して除去して官能基を露出させることができる。

好ましい形状において、放射は紫外線(UV)、赤外線(IR)又は可視光である。更にさらに十分に記載するよう、保護基は、電界の存在下で除去され得る電気化学的に選択性の基であることもできる。さらに他の形状においては、脱保護のためにイオンビーム、電子ビーム、等を使用することができる。

幾つかの形状においては、暴露される領域、そしてそれ故に有するポリマー配列がその上で合成される範囲は約1μより小さく又は1μ未満である。好ましい形状においては、暴露される範囲は約10.000μ<sup>2</sup>未満であり、さらには好ましくは100μ<sup>2</sup>未満であり、そして幾つかの形状においては單一分子と同様に少數のための結合部位を含むことができる。これらの領域内で、各ポリマーは好ましくは実質的に

純粋な形で合成される。

元への基体の既知領域の基部と同時に又はその後に、表面を第一モノマー-ユニットM<sub>1</sub>と接触させ、このユニットは膜保護膜において露出された官能基と反応する。第一モノマーは保護基P<sub>1</sub>を有する。P<sub>1</sub>はP<sub>2</sub>と同じでもよく又は異っていてもよい。

柱って、第一サイクルの後、表面の既知第一領域は次の配列：

S-L-M<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>

を含んで成り、他方表面の残りの領域は次の配列：

S-L-P<sub>2</sub>

を含んで成る。次に、表面の第二領域（これは第一領域を含むことができる）を元に暴露し、そして保護基P<sub>2</sub>を有する第二モノマーM<sub>2</sub>（これはM<sub>1</sub>と同一でもよく、又は異っていてもよい）と接触せしめる。P<sub>2</sub>はP<sub>1</sub>及びP<sub>2</sub>と同一でもよく、又は異っていてもよい。この第二サイクルの後、基体の異なる領域は次の配列：

S-L-M<sub>1</sub>-M<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>

S-L-M<sub>1</sub>-P<sub>2</sub>

S-L-M<sub>2</sub>-P<sub>1</sub> 及び/又は

S-L-P<sub>2</sub>

の1又は複数を含んで成るであろう。基体が所定の長さの所定のポリマーを有するまで上記の工程を反復する。先に構成される基体の場所及び表面に残り表面に構成される試薬を固定することにより、各配列の場所が知られるであろう。

### 特許平4-505763 (9)

次に、基体の残る部分は全部から保護基を除去し、そして場合によっては配列をチャップユニットCによりチャップする。この工程が、次の一般式：

S-(L)-(M<sub>1</sub>)-(M<sub>2</sub>)-(M<sub>3</sub>)-(M<sub>4</sub>)-(C)

（式中、中カッコ（ ）は場合によっては存在する基を示し、そしてM<sub>1</sub>～M<sub>4</sub>はモノマーの任意の配列を示す）

により示される複数のポリマーを持つ表面を有する基体をもたらす。モノマーの数は広範囲の数にわたることができるが、しかし好みの基体においてはそれは2～100の範囲であろう。

基つかの構造においては、基体上の複数の場所でポリマーは共通のモノマー-ユニット配列を含むべきである。例えば、第一の場所において配列S-M<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>-M<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>をもして第二の場所において配列S-M<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>-M<sub>3</sub>-P<sub>3</sub>を合成することが望ましいであろう。この工程は第一の場所の照射をもって開始され、これに続くM<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>との接触が第一場所での配列S-M<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>をもたらす。次に第二場所を照射しそしてM<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>と接触させて第二場所での配列S-M<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>を得る。次に、第一場所及び第二場所の両方を封鎖し、そしてダイマーM<sub>1</sub>-M<sub>2</sub>と接触せしめることにより第一場所における配列S-M<sub>1</sub>-M<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>、及び第二場所における配列S-M<sub>1</sub>-M<sub>3</sub>-P<sub>3</sub>を得る。留までもなく、任意の長さのサブ配列を用いることができる。これには2以上の範囲のモノマー、2～100個のモノマー、2～20個のモノマー、そして最も好みくは2～3個の範囲モノマーが含まれる。

-coup 1 (d) 装置による微光の検出、微光調節等により検出される。受容体の結合が検出される場所におけるポリマーの配列を用いて受容体に對して相補的である配列の全部又は部分を決定することができる。

本明細書において本発明の利用は主として生物学的活性についてのスクリーニングに當及しながら説明される。しかしながら、本発明は他の多くの用途を有する。例えば、本発明は情報の格納（例えば、光ディスク上での）、分子電子装置の製造、分離科学（separation science）における定量相の形成、染料及び増白剤の製造、写真、並びに合成的ポリマー配列の分子認識を介しての表面上のパターンにおける細胞、蛋白質、レクチン、核酸、ポリサッカライド等の固定化、において使用することができる。両ビ化染料を構築して段々と異なる濃度で合成することにより、活性化を初期するため又は例えば増加する量の抗原に対して抗体を活性化するため又は例えは増加する量の抗体に対して抗原を活性化するため又は例えは増加する量の抗体鎖（dipstick）を開始するために初期が構築されるであろう。基つかの複数分子を連接して合成することにより、より効率的な多段階合成によって「座標固定化」（coordinate immobilization）が達成される。座標固定化はまた、電子伝導系のため、並びに構造的完全性及び他の好みの性質、例えば活性、選択性等を与えるために用いることができる。

他の構造に従えば、分子生動分配及び表面連鎖性を比較することができる。例えば、陽アミノ酸又は陰性アミノ酸に対する選択性を評価するため、ポリマーを試験タッグ

## 特表平4-505763 (10)

によりキャップし、そして柱の生物学的基体に暴露することができる。

## Ⅱ. ポリマー合成

図1はこの明細書に開示される本発明の1つの実施を示し、ここでは基体2が断面として示される。本質的に、任意の便利な基体を本発明において使用することができる。基体は生物学的、非生物学的、有機、無機、又はこれらの任意の組合せであることができ、粒子、ストランド、枕縫、ゲル、シート、チューブ、繊維体、密着、毛細管、パッド、スライス、フィルム、プレート、スライド等として存在する。基体は任意の便利な厚さ、例えばディスク、正方形、円形であることができる。基体は好みの平らであるが、他の種々の表面構造を取るであろう。例えば、基体はその上で合成が行われる隆起した又はくぼんだ部分を含むことができる。基体及びその表面は好みの、本明細書に記載する反応がその上で起る硬質の支持体を形成する。基体及びその表面はまた、適切な吸光特性を与えるように選択される。例えば、基体は、組合したラングミュア・プロジェクトフィルム (Langmuir-Blodgett film) フィルム、官能化されたガラス、Si、Ge、GaAs、GeP、SiO<sub>2</sub>、SiN<sub>x</sub>、改質シリコン、又は広範囲の種類のゲル又はポリマー、例えば、(ポリ)テトラフルオロエチレン、(ポリ)ビニリデンジフルオリド、ポリスチレン、ポリマーマスター、又はこれらの組合せであることができる。他の基体材料はこの開示を標記した後に当業者にとって明らかであろう。好みの基体においては、基体はその表面に開示される。

ためには8~50原子の長さを有すべきである。リンカーフィラメントは例えばアリールアセチレン、2~10個のモノマーユニットを含むエテレングリコールエリゴマー、ジアミン、ジアシド、アミノ酸、又はこれらの組合せであることができる。この開示に従らして他のリンカーフィラメントを使用することもできる。

他の基体に従えば、ある種の受容体への合成了されたポリマーの露出を改良するために、リンカーフィラメントはそれらの親水性/疎水性受容体に適して選択される。例えば、親水性受容体の場合、親水性基が合成されたポリマーに一層密接に接する形を許容するように、親水性リンカーフィラメントが好みである。

他の基体に従えば、リンカーフィラメントはまた宇宙装置に光触媒性基を備える。この光触媒性基は好みの保護基とは異なる波長において開裂される。このことが、異なる波長の光への暴露による合成了完了後の種々のポリマーの取り出しを可能にする。

リンカーフィラメントは、例えば(ポリ)トリフルオロクロロエチレン基を用いて炭素-炭素結合を介して、又は好みのシロキサン結合により(例えば、ガラス又は酸化鉄素基を用いて)基体に付加することができる。基体の表面とのシロキサンの結合は、1つの基体においては、トリクロロシリル基を出発するリンカーフィラメントの反応を介して形成される。リンカーフィラメントは場合によっては指定された堅度で、すなわち合成されたラングミュア・プロジェクトフィルム中のヘッドグループ (head group) の部分として取付けられる。

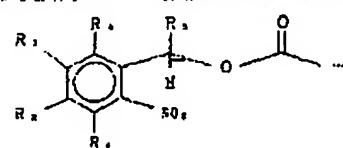
いて、基体は10人未満の表面レリーフ特性を有する単純なシリコン又は平らなガラスである。

幾つかの基体に従えば、基体の表面はよく知られた方法によりエッチングすることにより所望の表面特性を与える。例えば、南、V-溝溝、メーテ(台地)構造等の形成により、合成領域を突き立てる先の焦点内により常に振ることができる、波光炉等からの強光の最大化のための反射「鏡」構造を備えることができる。

固体基体の表面は通常、常にではないが、基体と同じ材料で構成される。すなわち、表面は広範囲の種類の材料のいずれか、例えばポリマー、プラスチック、樹脂、ポリサッカライド、シリカもしくはシリカを基材とする材料、炭素、金属、無機ガラス、膜、あるいは前に挙げた基体材料のいずれかから構成される。幾つかの基体において、表面は、すでに引用した出願番号404,920の教示に記載する基体の表面に堅く結合したかこまれた (coated) 結合層の使用を提供する。好みの表面は反応性基を含み、この基はカルボキシル、アミノ、ヒドロキシル等であることができる。さらに好みの表面は光学的に透明であり、そしてシリカ表面に見られるように表面シリコーン官能基を有するであろう。

基体の表面4は好みのリソルバーフィラメントの層を有するが、リソルバーフィラメントは本発明の必須の要素ではないと理解されよう。リソルバーフィラメントは好みの表面は基体と反応剤のリソルバーフィラメントの直接結合又は表面に存在する。保護基は負の保護基(すなわち、暴露の後にリソルバーフィラメントとの反応性を有する保護基)又は正の保護基(すなわち、暴露の後にリソルバーフィラメントとモノマーとの反応性を低下する保護基)のどちらでもよい。負の保護基の場合、反応性の追加の段階が必要であろう。幾つかの基体においては、それは加熱により行われるであろう。

リソルバーフィラメントは広範囲の基体の正の光反応性基から選択することができる、これには好みのニトロ芳香族化合物、例えば2-ニトロベンジル誘導体又はベンジルスルホニルが含まれる。好みの基体において、2-ニトロペラトリルオキシカルボニル (NVO<sub>2</sub>)、2-ニトロベンジルオキシカルボニル (NBO<sub>2</sub>) 又は2-オージメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル (DOD<sub>2</sub>) が使用される。1つの基体においては、ニトロ基に対してオルト位にベンジル性水素を含有するニトロ芳香族化合物、すなわち、次の式:



## 特許平4-505763 (11)

(式中、R<sub>1</sub> はアルコキシ、アルキル、ハロ、アリール、アルケニル又は水素であり；R<sub>2</sub> はアルコキシ、アルキル、ハロ、アリール、ニトロ又は水素であり；R<sub>3</sub> はアルコキシ、アルキル、ハロ、ニトロ、アリール又は水素であり；R<sub>4</sub> はアルコキシ、アルキル、水素、クリール、ハロ又はニトロであり；R<sub>5</sub> はアルキル、アルキニル、シアノ、アルコキシ、水素、ハロ、アリール又はアルケニルである) で表わされる化学物質が使用される。使用し得る他の物質には、一ヒドロキシ-α-メチルシンナセイル基等が含まれる。光除去可能な保護基は例えば Patchornik, *J. Am. Chem. Soc.* (1970) 92: 6333 及び Hiekkilä, *J. Org. Chem.* (1974) 39: 192 に記載されている。これらを引用により本明細書に組み入れる。

他の様様においては、正の反応性基が導体中の状態との反応のために活性化される。例えば、5-アプロモ-7-ニトロイソグリシン基は、カルボニルに結合する場合、48.0%の光への曝露の際に反応する。

第二の様様においては、リンカーフォン子上の反応性基は、シンナメート基を含めて広範囲の性質の負の光反応性基から選択される。

あるいは、反応性基は電子ビームリソグラフィー、X-線リソグラフィー、又は他の技術により活性化又は不活性化される。電子ビームリソグラフィーのための適当な反応性基にはスルホニルが含まれる。例えば電荷部への曝露を含めて他の方法を使用することもできる。この開示に照らして他の反応性基及び活性化方法を使用することもできる。

*Phys. Lett.* (1977) 61: 426-429 (これを引用により本明細書に組み入れる) に記載されている様な干渉 (Interference) マスクを用いることができる。

基体に当たられる光のコントラストを増強するため、幾つかの方法に従えば、マスクと基体との間にコントラスト増強材料を設けるのが好ましい。このコントラスト増強層は光により分解される分子、例えばキノンジアジド、又は柱の成長において一時的に解離される物質を含んで設けることができる。物質の一時的解離は、光が当たられた場所でのより大きな貫通を可能にし、これによりコントラストが増強されるであろう。あるいは、コントラストの増強は、クラッド光ファイバー束 (cladded fiber optic bundle) により得ることができる。

光は専用の白熱燈、シーラー、レーザーダイオード等からのものであることができる。非平行光源が使用される場合、基体への光の反射を防止するため厚いマスク又は多層マスクを用いるのが好ましい。さらに、幾つかの方法においては、合成を解離するために異なる波長に対して選択性の基を用いることが望ましい。例えば、異なる波長に対して選択性の基を用いることにより、オリマーの合成における枝位置を選択し又はあるマスキング段階を略すことができる。幾つかの反応性基をその保護基のための対応する波長と共に表 1 に示す。

図 1 に示すように、連結分子は好ましくは、例えば、半導体工場において用られておりとして例えば See, *VLSI Technological*, McGraw-Hill (1983)、及び Headら、*Introduction to VLSI Systems*, Addison-Wesley (1980) (これらをすべての目的のために引用により本明細書に組み入れる) において知られているタイプのリソグラフィー技術を用いて、適切なマスクを介して光が曝露される。光を、保護基を含む基体に、又は保護基の除去のために必要とされる光の波長に対しても基体が透過性である限り基体の背面に当けることができる。図 1 に示す基板においては、光は保護基を含む基体の表面に向けられる。図 1 はこの様なマスク技術の使用を示し、これらの性質は超速 10 s 及び 100 s 中の連結分子を活性化しそして官能基を露出させるために正の反応性基に適用される。

マスク 8 は、1 つの態様においては、不透明な材料の層により部分的に被覆された透明な支持体材料である。不透明材料の部分が露出され、不透明材料は所望の正確なパターンで支持体表面に残る。図 1 に示すように、マスク 8 は基体表面と直接に接触され、その上に投影され、又はそれに近づけられる。マスクの「開口部」は、光除去可能な保護基を基体から除去することが望まれる基体上の場所に対応する。専用の整合 (alignment) マーク (示してない) を用いて、事前のパターン化段階を経たマスクが次々と正確に重層され、あるいはより複雑な技術が使用される。例えば、Flanders ら、*New Interferometric Alignment Technique*, *J. App.*

## 表 1

基	およそその保護基
ニトロベラトリルオキシカルボニル (NBOC)	UV (300-400nm)
ニトロベンジルオキシカルボニル (BBOC)	UV (300-350nm)
ジメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル	UV (280-300nm)
5-アプロモ-7-ニトロイソグリニル	UV (420nm)
0-ヒドロキシ-α-メチルシンナモイル	UV (300-250nm)
2-オキシメチレンアンスラキノン	UV (350nm)

本明細書においては、本発明を主として基体の選択された領域を隔離するためのマスクの使用により説明するが、他の技術を用いることもできる。例えば、突起されたレーザーステムはダイオード光源のもので基体を隔離することができる。この様な技術は例えば米国特許出願 4,719,615 (Peyzer ら) に記載されており、引用によりこの明細書に組み入れる。他の様様においては、レーザーガルバノメータースキャンナーが用いられる。他の様様においては、専用の装置 (本明細書で「光バルブ」と名する) 又は光ファイバ光線上で又はそれらと接続して合成を行うことができる。装置を適切に調整することにより、光が基体上の選択された領域に接するように光を選択的に制御する (modulate) ことにより、光が基体上の選択された領域に接するように光を選択的に制御することができる。あるいは、光が選択的に当たられる一連の光ファイバーの束で合成を行うことができる。光の導露の場所を制御するための手段は当実考に明らかであろう。

## 特表平4-505763 (12)

基体は培養（示していない）と接触して又は接触しないで遮蔽されることがあり、そして好ましくは培養と接触して遮蔽される。幾つかの基板に従えば、この構造は、放射により生成した副生成物がポリマーの合成を妨害するのを防止する機能を有する。この様な副生成物には例えば二酸化炭素、二トロソカルボニル化合物、ステレン酸原体、インドール酸原体、及びそれらの光化学反応の生成物が含まれよう。あるいは、溶媒は基体の吸着率を調整させるための試薬を有することができる。溶媒に添加される試薬にはさらに、例えば、酸性もしくは堿基性の緩衝剤、チオール、還元剤（例えばNADH）、又は所与の官能基と反応することが知られている試薬（例えば、ブリールニトロソタグリオキシル酸-アリールホルムヒドロキサメート+CO<sub>2</sub>）が含まれる。

照射領域と同時に又はその後に、リソウ分子を洗浄し、あるいは図2中の領域1-2と及び1-6に「A」で示される第一モノマーと接触せしめる。第二モノマーは、光に曝露された連結分子の活性化された官能基と反応する。好ましくはアミノ酸である第一モノマーはまた光保護基を有している。モノマー上の光保護基は連結分子中に用いられた保護基と同一でも又は異っていてもよく、そして前記の保護基のいずれかから選択される。1つの基板においては、Aモノマーのための保護基は基N B O C及びN M O Cから選択される。

その後、図3に示すように、先行するマスキング領域において保護されていた領域として示される領域1-4と及び

1-6中のリソウ保護基を除去しそして官能基を露出するようには覆いられたマスクを用いて図2の工程を反復する。第一マスクの位置変えの1つの選択法として、多くの基板において第二マスクが使用されるであろう。他の基板においては、幾つかの段階が複数の逐次段階における普通領域の照射をもたらすであろう。図3に示すように、照射された領域間の分離をもたらすのが望ましい。例えば、既列の許容のためには約1～5mmの分離が適当であろう。

次に、図4に示すように、基体を第二の保護されたモノマー「B」に曝露してB領域1-6と及び1-6を生成せしめる。次に、A領域1-2と及びB領域1-6上の保護基を除去しそして反応性基を露出するよう基体を及びマスクする。基体を及びモノマーBに曝露し、図6に示す構造の形成をもたらす。ダイマーB-A及びB-Bが基体上に生成されている。

Aについて上に記載したと同様の引き続く一連のマスキング及び接触段階（示していない）が図7に示す構造をもたらす。この方法は、B及びAのすべての可能なダイマー、すなわちB-A、A-B、A-A、及びB-Bをもたらす。

合成功能、及び各個々のポリマーの合成のための領域は通常のサイズ及び形状のものでよい。例えば、正方形、掩蔽版、長方形、三角形、円形、又はこれらの部分、並びに不規則な複合形態を用いることができる。冗長性の目的で同一の基体に2連の合成領域を適用することもできる。

1つの基板においては、基体上の領域1-2及び1-6は約1mmと10<sup>-10</sup>cmとの間の表面積を有するであろう。幾つかの

基板においては、領域1-3及び1-6は約10<sup>-1</sup>cm、10<sup>-2</sup>cm、10<sup>-3</sup>cm、10<sup>-4</sup>cm、10<sup>-5</sup>cm、10<sup>-6</sup>cm、10<sup>-7</sup>cm、10<sup>-8</sup>cm又は10<sup>-9</sup>cm表面の面積を有する。好ましい基板においては、領域1-2及び1-6は約10×10mmと500×500mmとの間である。

幾つかの基板においては、单一の基体は10種類より多くのモノマー配列を支持し、そして好ましくは100種類より多くのモノマー配列を支持しており、但し幾つかの基板においては約1%、10%、10%、10%、10%、10%又は10%種類より多くの異なる配列が1つの基体に与えられる。今までもなく、モノマー配列が合成される基体の1領域内で、モノマー配列が実質的に純粋であることが好ましい。幾つかの基板において、基体の領域は少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の純度を有する。

幾つかの基板に従えば、生物活性の最初のスクリーニングを提供するために单一の領域内に意図的に幾つかの配列をもたらし、次に有意な結合を示す領域内の物質をさらに評価する。

#### IV. 反応器系の1つの実験的範囲

図6は、水発明の1つの段階に従って開発された基体上にポリマーを合成するための反応器系1-0の好ましい基板を示す。この反応器系はその表面上に空隙1-0を有する体部1-2を含む。好ましい基板においては空隙は約50～

100mmの深さを有し、約500mmの深さが好ましい。

空洞の底には好ましくは隔離100の隔壁が設けられており、この隔壁はこの底の平面に、及び図の平面に対して平行に伸びている。隔壁は好ましくは約50～200mmの深さを有しそして約2～3mmの開闊を有する。隔壁の目的はより良い混合のために乱流を生じさせることである。空洞の底部裏面は、突き当たる光の反射を防止するために、好ましくは吸光性である。

基体1-2は空洞1-0の上方に配置される。基体にはその底部裏面にそって、介在するリソウ分子を浮て又は伴わないN VOCのごとく光触起可逆な保護基が設けられる。この基体は好ましくは度いスペクトルの光に対して透過性であるが、しかし幾つかの基板においては当該保護基を除去する波長に対してのみ透過性である（例えば、N VOCの場合）。幾つかの基板において、基体は専用の隔離板ガラススライド又はカバースリップである。基体は好ましくは、適切な物理的支撐を提供しながら可能な限り薄いものである。好ましくは、基体は1mm未満の厚さを有し、さらに好ましくは0.5mm未満の厚さを有し、さらに好ましくは0.05mm未満の厚さを有する。筋の好ましい基板においては、基体は石英又はシリコンである。

基体及び体部は入口1-0及び出口1-6を除き空洞を封止するために設立つ。幾つかの基板においては、体部及び基体は1個又は複数個のガスケットによって封止のために適合

していてもよい。好みしい態様に限れば、体部は2つの同心ガスケットを有し、そして介在する空間はガスケットへの基体の適合を遮断するために真空体に封締される。

流体は、例えばエルデックス・ラボラトリーズ (Eldex Laboratories) により製造されたモデルNo B-120-Sでもよいポンプ116により前記入口を通じて空洞にポンプ給送される。遮断された流体はポンプにより空洞に入り、該空洞を通過しそして出口から放出され、さらに遮断されるか又は閉鎖される。該つかの態様においては遮断を防ぐため医療器を用音響遮断にかけ、及び/又は加熱してよい。

基体112の上方にはレンズ120が設けられており、このレンズは例えば2インチ100mm魚眼距離の複屈折シリカレンズであってもよい。ニンバクトな点のためには、光源124からの光を基体に向けるため反射鏡122を設けてよい。光源124は例えば、オーリエル (Orion!) により製造されそしてモデルNo 66024を有するXe (Hg) 光源であることができる。第ニレンズ128はレンズ112と組合わされてマスクイメージを基体に投影する目的で設けることができる。リソグラフィーのこの応用を本明細書において投影プリントティングと称する。この顯示から明らかかなように、該つかの態様に限れば近接プリントティング (proximity printing) 等を用いることもできる。

光源からの光は、マスク128の結果として基体の遮断された場所にのみ到達することが許される。マスク128は創

造作において、基体を空洞上に置き、そしてそれに対しても遮断する。基体を切削する工程のすべての操作は、主として又は基体として、保護基を除去する前の光路以外の段長の光により照らされた室所で行われる。例えば、NYOCの場合、UV光をほとんど又は全く遮断しない専用の暗室光により室が用らざるべきである。すべての操作は、好みしくはおよそ室温において行われる。

まず、脱保護流体 (モノマーを含まない) が空洞を通して循環される。この液体は好みしくはジオキサン溶液中5%硫酸であり、この溶液は露露されたアミノ基をプロトン化し続けるために役立ちそして先分解副生成物とのそれらの反応性を低下させる。この脱保護流体には、例えば、光を吸収して反応及び不所要の光分離を遮断するためには後立つN, N-ジエチルアミノ2, 4-ジニトロベンゼンのごとき吸収材料を含めることができる。

次に、スライドをマスクからの光路に配置して基体上の第1場所が照明されるようにし、そして次に脱保護する。好みしい態様においては、基体を約1~1.5分間照明する。好みしい照明時間は36.5nmの光で10~20mW/cm<sup>2</sup>にて約1.0分間である。光分離の後、例えば塩化メチレン中ジ-イソブロピルエチルアミン (DIEA) の溶液により約5分間スライドを中和する (すなわち約7のpHにする)。

次に、第一モノマーを基体上の第一場所に置く。密封の後、スライドをはずし、ばらばらに処理し、そして流れセル中に再設置する。あるいは、好みしくはやはり保護基により保護

### 特表平4-505763 (13)

えば、その上にエッティングされたクロムを有するガラススライドである。1つの基板においてマスク128は遮断場所と不遮断場所の格子を有する。この様なマスクは例えばフォト・サイエンス社 (Photo Sciences, Inc.) により製造されるであろう。光はマスクの透明領域を自由に通過するが、しかし船の領域においては反射されるか又は吸収される。従って、基体の遮断された場合のみが光に曝露される。

前記のように、基体の頭部を遮断的に各露するために常用のマスクに代えて光パルプ (LCD) を用いることができる。あるいは、マスクのコントラストの強化の目的で又は光が当たられる領域を限定する唯一の手段として、ショット・グラス社 (Schott Glass, Inc.) から入手できるような光ファイバーフェースプレート (fiber optic faceplate) を用いることができる。この様なフェースプレートは図8Aに示される反応器中の基体上又はそのすぐ上方に置かれるであろう。さらに他の領域においてはコントラストの増強のためにフライスアイ (flys-eye) レンズ、テーパー漫光ファイバーフェースプレート等を用いることができる。

光の波長より小さい領域の照射を得るためにさらに巧みな技術を用いることができる。例えば、好みしい態様に限れば、例えばマイクロビットの先端の分子マイクロクリスタルにより光が基体に向けられる。この様な装置は Liebermanら 「A Light Source Smaller Than the Optical Wavelength」, Science (1990) 247: 59-61 に記載されており、これをすべての目的のため引用により本明細書に組み入れる。

されている第一モノマーを含むする流体をポンプ116により空洞を通して循環させる。例えば、第一場所で基体にアミノ酸Yを結合させることが望まれる場合、アミノ酸Y (その上に保護基を保護基を有する) 又、該モノマーを反応性にするために使用される試薬及び/又はキャリヤーと共に貯藏容器118からポンプにより空洞を通って循環させ、そして該ポンプの入口に戻す。

好みしい態様においては、モノマー-キャリヤー溶液は、第一溶液 (本明細書において溶液「A」と称する) 及び第二溶液 (本明細書において溶液「B」と称する) を組合することにより形成する。表2に溶液Aのために使用し得る混合液の例を示す。

#### 表2

##### 代表的アミノ-キャリヤー溶液「A」

100ml	NYOCアミノ保護アミノ酸
37ml	HOBt (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)
250ml	DMF (ジメチルカルボンアミド)
86ml	DIEA (ジイソブロピルエチルアミン)

溶液Bの組成を表3に示す。溶液A及びBを混合し、そして室温にて約8分間反応せしめ、次に2mlのDMFにより抽出し、次に500mlをスライドの表面に適用するか、あるいは該溶液を反応器を通して循環させ、そして室温にて約2時間反応させる。次にスライドをDIEA、塩化メチレン及びエタノールにより洗浄する。

第 3  
代表的モノノマー・チャリュー接着「日本」

250 $\mu$	D M F
111cc	BOP (ベンゾトリアゾリル-ヨ-オキシ ドリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート)

結合されるべきモノマーを含有する溶液が空間を透って周囲する際、該アミノ酸又は他のモノマーはそのカルボキシ末端において、脱保護されている基体の頭端上のアミノ基と反応するであろう。云うまでもなく、本発明を空間を透してのモノマーの溶液を用いて説明するが、スライドを反応器から取り外しそしてそれを適切なモノマー溶液に浸漬することによって本発明を実施することもできる。

第一モノマーの付着の後、次にこの第一アミノ酸を含有する溶液を系から排除する。アミノ酸の除去が保証される程十分な量（例えば、空間及びチャリュー管路の容積の約30倍）のD M F / 亜化メチレンの混液の後、マスク又は基体を配置しあるいは新たなマスクを使用して基体上の第二領域を先に露出し、そして元124を第二の基質のために用いる。これが基体上の第二領域を脱保護し、そしてこの方法を目的のポリマー配列が形成されるまで反復する。

次に、該固体化された基体全体を、詳しくは例えば蛍光標識により保護された柱状の受容体に暴露する。これは、該受容体の溶液又は懸濁液を空洞を透して曝露させると、又はスライドの表面をばらばらに接触せしめることにより行う。

のため、追加の抗体（例えば、ヤギ-マウス-ヤギ）を用いてこの方法を反復することができる。

終ましい態様においては、順序付けられた一連のマスクが使用される。幾つかの態様においては、所与のモノマーセットの可能なポリマーのすべてを合成するために1個という少い数のマスクを使用することが可能である。

例えば、4種類の塩基から16種類すべてのジスクレオチドを合成することが望まれる場合、1 cm<sup>2</sup>平方の合成領域が各0.25 cm<sup>2</sup>幅の16個の列に概念的に分けられる。第一マスクは基の最左列を暴露し、ここではAが結合する。第二マスクは次の列を暴露し、ここではBが結合され、次にC列のための第三マスクが使用され、そしてDのために最左列を暴露する最終マスクが用いられる。第一、第二、第三及び第四マスクは異なる場所に移動される單一マスクであることができる。

ダイマーの第二ユニットのためにこの操作は水平方向に反復される。この時、マスクはやはり0.25 cm<sup>2</sup>幅の水平平行の暴露を可能にする。反応領域の水平の4分の1を暴露するマスクを用いてA、B、C及びDが逐次結合される。得られる基体は4塩基の16種のダイマーすべてを含有する。

ジペプチドを含有するために用いられる9個のマスクは移動、又は回転により相互に関連している。実際に、それが適切に移動又は回転されれば1個のマスクを使用することができる。例えば、單一の透明領域を有するマスクを逐次使用して垂直列のそれぞれを暴露し、90°移動させ、そして次に水平平行の暴露のために逐次使用することができる。

## 特許平4-505763 (14)

受容体は、概念的配列をもむ基質のある領域に優先的に結合するであろう。

抗体は、例えばPBS (リン酸緩衝液) 中約1%のBSA (ウシ血清アルブミン) 及び0.5% Tweenの溶液であることができる「スーパー・カクテール」と一緒に称されるものの中に典型的には懸濁される。抗体はスーパー・カクテール緩衝液中に例えば約0.1~4 g/Lの最終濃度に希釈される。

図8Bは、図8Aに示す反応器の他の好みの結構を示す。この結構に従えば、マスク120が基体に直接接触して置かれる。詳しくは、光の分散の効果を減少させるように、マスクのエッティングした部分を下に向けて配置される。この構造に従えば、マスクは基体に近接して置かれるので像影レンズ120及び126は必要でない。

この技術のシグナル対ノイズ比を高める目的で、本発明の幾つかの態様は、第一の構造されているか又は標識されていない受容体への基質の曝露、及びこれに続く、該第一受容体上の複数の部位に結合する標識された第二受容体（例えば抗体）への曝露を用いる。例えば、第一受容体が第一の種の動物に由来する抗体であれば、第二受容体は該第一の種と固連するエピトープに向けられた第二の種に由来する抗体である。例えばマウス抗体の場合、マウス抗体上の複数の部位に結合させるために抗マウスである蛍光標識されたヤギ抗体又は抗血清を用いて、各結合部位への單一マウス抗体の結合と比べて数倍の蛍光を得ることができる。異なるシグナルの強度

度及び度は、第一レベルにおいて8種類の異なるモノマー、第二レベルにおいて4種類の異なるモノマー、及びストリップパターンの第三レベルにおける4種類の異なるモノマーを有する3モノマー（塩基）のポリマー鎖の合成のための、それぞれマスクアリグラム及びシンプルアウトプットの計画のためのQuick Basicの常識的なコンピュータープログラムを提供する。プログラムのアウトプットは、セルの数、各マスク上の「strips」（光吸收）の数、及びマスクの各暴露のために必要な移動の量である。

特表平4-505763 (15)

五

Basic Parameter Process	Lighting Standard Output
<pre> CDEF1 A=2 B2D 94201, 45207, 15302 PC = 45111 CDEF1 D FOR CDEF2 AS #1  JMAX = 3           "Number of residues" k(1) = 3; k(2) = 3; k(3) = 3           "Number of building blocks for case 1,2,3" g = 1; lmax(k) = 1  FOR j = 1 TO JMAX; g = g + k(j); NEXT j  w(j) = G1 * w(j) + g / WID  PRINT #1, "NUMBER,BAS", DATES, TIMES; PRINT #1, PRINT #1, "SERIE,""Number of residues=nn"; gmax FOR j = 1 TO JMAX; PRINT #1, "Residue", j, "Building blocks"; j; k(j) NEXT j PRINT #1, " " PRINT #1, "G1,M1,""Number of cells=nn"; g; JMAX #1.  FOR j = 1 TO JMAX   kmax(j) = Max(j + 1) - k(j) - 1   w(j) = w(j + 1) / k(j) NEXT j  FOR j = 1 TO JMAX   PRINT #1, WID; "Mask for residue nnn"; j; PRINT #1,   PRINT #1, "SERIE,""Number of stripes=nn"; lmax(j)   PRINT #1, "WID"; "WID of each stripe=nn"; w(j)   FOR l = 1 TO kmax(j)     a = l + (1 - k) * w(j - 1)     b = a + w(j); t     PRINT #1, "SERIE,""Strips no begin at location a and ends at bnn"; l; a; b   NEXT l   PRINT #1,   PRINT #1, "WID"; "For each of nn building blocks, translate mask by nn"   DATA(j); w(j); #1;   PRINT #1, "SERIE", j; PRINT #1, NEXT j </pre>	<pre> Number of residues 1 Residue 1 3 building blocks Residue 2 4 building blocks Residue 3 5 building blocks  Number of cells 63 Mask for residue 1 Number of stripes 1 Width of each stripe 10 Stripe 1 begins at location 1 and ends at 10 For each of 3 building blocks, translate mask by 20 cell(s)  Mask for residue 2 Number of stripes 3 Width of each stripe 3 Stripe 1 begins at location 1 and ends at 3 Stripe 2 begins at location 11 and ends at 21 Stripe 3 begins at location 21 and ends at 31 For each of 4 building blocks, translate mask by 9 cell(s)  Mask for residue 3 Number of stripes 12 Width of each stripe 1 Stripe 1 begins at location 1 and ends at 1 Stripe 2 begins at location 6 and ends at 2 Stripe 3 begins at location 11 and ends at 22 Stripe 4 begins at location 16 and ends at 25 Stripe 5 begins at location 21 and ends at 30 Stripe 6 begins at location 26 and ends at 29 Stripe 7 begins at location 31 and ends at 31 Stripe 8 begins at location 36 and ends at 36 Stripe 9 begins at location 41 and ends at 41 Stripe 10 begins at location 46 and ends at 46 Stripe 11 begins at location 51 and ends at 51 Stripe 12 begins at location 56 and ends at 56 For each of 5 building blocks, translate mask by 1 cell(s)  </pre>

\* Copyright 1990, Affymax R.V.

\* Copyright 1990, Affymax R.V.

#### V. 岩光検出装置の人体検査の試験

図9は装置上の岩光検出された受容体を接続するための垂直光検出装置を示す。装置112はx/y移動テーブル202の上に置かれる。好ましい態様においては、x/y移動テーブルはニュー・ポート社 (New port Corporation) により製造されるモデルNo PMS 000-A1である。x/y移動テーブルは、例えば適切にプログラミされたIBM PC/AT又はAT適合コンピューターであってもよい適切にプログラムされたデジタルコンピューター-204に接続されそしてそれにより制御される。さうでもなく、ここで示すために使用するATコンピューターに代えて他のコンピューター系、専用の目的のハードウェア等を容易に用いることもできる。本明細書に記載する移動及びデーター収集機能のためのコンピューターソフトウェアは、例えばナショナル・インストルメンツ (National Instruments) によりライセンスされる「Lab Windows」(すべての目的のため引用により本明細書に組み入れる)を含めて、市販のソフトウェアに蓄いて提供される。

装置及びx/y移動テーブルは、1又は複数の対物レンズ208を含む取扱機206のもとに置かれる。幾つかの態様においてはスペクトロフィジックス (SpectroPhysics) により製造されるモデルNo 2020-05アルゴンイオンレーザーであるレーザー-210からの光(約488nm)が、約520nmより長い波長の光を透過するかしらし488nmの光を反射するダイクロイックミラー (dichroic mirror)

207により岩体に向けられる。ダイクロイックミラー-207は例えばカール・ザイス (Carl Zeiss) により製造されるモデルNo F T 510である。次にこのミラーから反射された光は屈折鏡206に入り、この屈折鏡は例えばカール・ザイスにより製造されるモデルNo A x 10 s c 90 20であることができる。岩体上のフルオレッセインでマスクされた岩は約488nmの光で蛍光を発し、そしてこの蛍光は屈折鏡により集められ、そして鏡を通過するであろう。次に、岩体からの蛍光は波長フィルター-209を通りそして次に閉口框211を通過するように向けられる。枚葉フィルター-209は例えばメレス・グリオット (Melles Griot) 611により製造されるモデルNo OG 580であることがで8、そして閉口框211は例えばカール・ザイスにより製造されるモデルNo 477352/477380であることがある。

次に蛍光は、幾つかの基板においてはハママツにより製造されるモデルNo R 943-0-0である光導倍管212に入り、シグナルは前増幅器214において增幅され、そして光子が光子カウンター-216によりカウントされる。光子の数はコンピューター-204において基板の開放として記録される。例えば、前増幅器(214)はスタンホール・リサーチ・システムズにより製造されるモデルNo 3R440であることがで8、そして光子カウンターはスタンホール・リサーチ・システムズにより製造されるモデルNo 400であることがある。次に、岩体を次の場所に移し、そして工程を反復す

る。好ましい結果においては、データーは1~100μgごとに得られ、約0.5~1.0μgのデーター収集直角が好ましい。十分に高い蛍光を示す距離において、広視野照明を用いることCD検出器が用いられる。

レーザーに応答して用与の領域から生ずる電子の数をカウントすることにより、蛍光標識された分子が位置する基体上の場所を決定することができる。次に、例えばその表面に合成されたポリペプチドのマトリクスを有するスライドについて、ポリペプチドのどれが蛍光標識された受容体に対して相補的であるかを決定することができる。

好ましい結果に従えば、基体に当たられる光の強度及び時間は、蛍光放射を最大にしそしてバックグラウンドノイズを最小にすることによるシグナル対ノイズ比の改善のために、レーザー出力及びスキャンステージ速度を変えることにより調整される。

検出装置を、本明細書においては主として、標識された受容体の検出に関して説明したが、本発明は他の分野でも用途を有するであろう。例えば、本明細書において開示される検出装置は触媒、DNA又は蛋白質のゲルスキャンニング等の分野において使用することができるであろう。

#### VI. 受容体の相対結合度の決定

本発明のシグナル対ノイズ比は十分に高く、リガンドに対する受容体の存在又は不存在が検出され得るのみならず、種々の配列に対する受容体の相対的結合親和性を決定することができる。

120μgの水及び120μgの水酸化ナトリウムを含む95%エタノール1.2から取るアルカリ浴にスライドを12時間浸漬する。次にスライドを流水で洗浄しそして空気乾燥し、そして95%エタノールの溶液で一度すすぐ。

次に、ガラス表面又はリンター分子にアミノ基を付加する目的で、スライドを例えればアミノプロピルトリエトキシシランによりアミノ化する。しかし、この目的のためにオメガーオキシ化シランを用いることができる。1つの懸念においては0.1%のアミノプロピルトリエトキシシランが用いられるが、1.0~1%~1.0%濃度の溶液を使用することができ、約1.0~1%~2%が好ましい。0.1%混合物は、1.00μgの95%エタノール/5%水混合物に1.00マイクロリッター(μL)のアミノプロピルトリエトキシシランを加えることにより調整される。この混合物をおよそ両面温度にてロータリーシューカー上で約5分間攪拌する。次に、500μLのこの混合物を各洗浄されたスライドの一方の面の表面に適用する。スライドをこの溶液からダクトンし、そして例えば100%エタノールに浸すことにより3回すすぐ。

プレートが乾燥した後、これらを110℃~120℃の真空オーブンに約20分間入れ、そして次に空気にて約12時間アルゴン雰囲気中で活性化させる。次に、スライドをDMP(ジメチルホルムアミド)溶液に浸し、次に塩化メチレンにより10分間洗浄する。

次に、各アミノ基にNVO-C-GABAを結合をせらため、スライドのアミノ化された表面を、例えばDMP中NVO-C

#### 特表平4-505763 (16)

実際に、受容体は複数している段階でのペプチド配列に結合するが、複数の配列には他の配列に対するよりも強く結合することが見出される。多くの受容体分子が強く結合したリガンドの領域で結合するであろうから、強い結合親和性は弱い蛍光又はラジオグラフィーシグナルにより証明されるであろう。前に、受容体に対する弱い結合親和性を有するリガンドを有する基体の特定の領域においては比較的小数の受容体分子が結合するため、弱い結合親和性は弱い蛍光又はラジオグラフィーシグナルによって証明されるであろう。従って、リガンドの相対結合アビティ(アビティ)。

(又は、1種相互作用の場合には親和性)を、複数のリガンドを有する領域の蛍光又はラジオグラフィーシグナルの強度によって決定することが可能になる。

親和性についての半定量的データーもまた洗浄条件及び受容体の濃度を変えることにより得られるであろう。これは、例えば、最初のリガンド受容体対と比較することにより行われるであろう。

河、道

次の例は本発明の有効性を説明するためには提供される。すべての操作は、特にことわらない限りおよそ両面温度及び圧力において行われた。

#### A. スライドの調整

反応性基の結合の前に、好ましい結果においては酸性スライド又はガバースリットのごときガラス板基板である基板を精査するのが好ましい。1つの基板に従えば、例えば

-GABA(アーティノ酸) NHS (N-ヒドロキシサクシニミド)の3.0mM浴液約500μLに曝露する。

表面を、例えばDMP、塩化メチレン及びエタノールで洗浄する。

表面のすべての未反応アミノプロピルシランーすなわちNVO-C-GABAが結合しなかったアミノ基を、錯水醇とビリジンとの1:1混合物にて時間露露することによりアセチル基によりキャップする(更なる反応を防止するため)。この保護キャップ技術を行うことができる他の物質には錯水トリフルオロ酢酸、錯水酢酸無水物、又は他の反応性アシル化剤が含まれる。最後に、スライドをDMP、塩化メチレン及びエタノールにより再度洗浄する。

#### B. 「A」及び「B」の先端のトリマーの合成

図16は、2-モノマー・セット: G1<sup>+</sup>及びD<sup>+</sup> (それぞれ、「A」及び「B」により示す)の8種のトリマーの可能な合成を示す。6-ニトロペラトリルオキシカルボキシ酸(NVO-C-NH)残基で終るシラン基を担持するガラススライドを基体として調製する。アミノ基においてNVOにより保護されたG1<sup>+</sup>及びD<sup>+</sup>の活性エステル(ペントフルオロフェニル、OBz等)を試験として調製する。この群には関係ないが、モノマー・セットのために直接保護基が必要な場合、これらは主端を保護するため使用される光の波長において光反応性であってはならない。

サイズのモノマー・セットについて、長さのすべての可能な配列を合成するためにはカム・サイクルが必要である。

1つのサイクルは次のことから成る：

1. 次の接着が付加されるべき部位でのアミノ基の露出のための適切なマスクを通しての照射、及び該保護の副生成物を除去するための適切な洗浄。

2. 既存1において特定された部位においてのみ反応するであろう单一の活性化されそして保護された（同じ光化学的に除去可能な基による）モノマーの添加、及び過剰の試薬を表面から除去するために適度な洗浄。

1つの順序においては、上記のサイクルは基体上の各場所が1つの基基により點滅されるまでモノマーセットの各構成員について反復される。他の順序においては、次の場所への移行の前に既存の基基が1つの場所において次々と付加される。サイクル時間は一基にカップリング反応速度により制限され、今や自動化されたペアチド合成においては20分間と短い。場合によってはこの段階の後に、後面の状態のために整列を安定化するために保護基の付加を行う。ポリマー中の複数のタイプ（例えばオリマー）のため、全表面の最終的保護基（光保護基の除去）が必要かも知れない。

さらに詳しくは、図10Aに示すように、カレス20は領域22, 24, 26, 28, 30, 32, 24及び36を構成する。図10Bに示すように領域30, 32, 34及び36をカスクレ、そしてガラスを照射し、そして「A」（例えば817）を含有する試薬に曝露し、図10Cに示す構造を得る。次に領域22, 24, 36及び28をマスクし、ガラスを照射し（図10Dに示すように）、そして「B」（例えば817）を含有する試薬に曝露する。

必要とされるリングラフィー領域の最大数は一層に、モノマーの各「層」についてであろう。すなわち、必要とされるモノマーの数（そして、それ故にリングラフィー領域の数）は $2^k \times 8$ であろう。透過性マスク領域のサイズは合成のために利用され得る基体の面積及び形成されるべき配列の数に依存するであろう。一般に、合成領域のサイズは：

合成領域のサイズ=  $(A/S)$

であり、ここで

Aは合成のために利用可能な面積であり、そして  
Sはこの全面積において望まれる配列の数である。

本明細書に開示されるフェトリリングラフィー技術名前において、1つの基体上で数千足は数百万のオリゴマーを同時に製造するためには前記の方法を容易に用い得ることを、当発明は認知するであろう。従って、この方法は、多段の剥離法（トーリー、テトラー、ベンダー、ヘキサー、ヘブラーもしくはオクタヘブラー、又はより大きなペアチド（又は、対応してペリヌクレオチド）を等に試験するための可能性をもたらすであろう。

上記の方法は手動の例により本法を説明している。さうでもなく、自動化法は半自動化法を用いることでもさう。試薬の自動添加及び除去によって、必要とする試薬の容量を最小にしそして反応条件をより生産限く調節するために、基体を流れケル中に配置することができる。次に用いるマスクは手動的又は自動的に適用することができる。

#### 特表平4-505763 (17)

pmol)を含有する試薬に曝露して図10Bに示す構造を得る。図10Bに示される構造が得られるまで、示されるようにセクションを次々にマスク及び曝露して工具を進行させる。ガラスを照射し、そして場合によってはアセチル化により保護基をキャップする。示されるように、エタノールのすべての可能なトリマーが得られる。

この例においては透析保護基の除去は必要でない。反応により、エクシングオール及びトリフルオロ酢酸による処理によって保護基の除去を行なうことができる。

一般に特定のポリマー群を得るために必要な段階の数は、

$\log n = (I)$

により定義され、ここで

$n$ —モノマーのベースセット中のモノマーの数、及び  
 $I$ —ポリマー鎖中のモノマーニットの数。

である。

他方、長さ $m$ の配列の合成される数は、

$n^m = (2)$

である。

旨うまでもなく、やはりより短い長さを有するポリマーの合成を含むであろうマスク法を用いることにより、一層大きな多段階が得られる。複数の層において、より短いか又はそれと同じ長さを有するすべてのポリマーが合成されれば、合成されるポリマーの数は：

$n^m + n^{m-1} + \dots + n^1 = (3)$

であろう。

#### C. アミノプロピル基及び亜光基のダイマーの合成

アミノプロピル基及び亜光基のダイマーの合成において、基体として官能化されたドラゴア（diluropore）膜を用いた。ドラゴア（diluropore）膜はアミノプロピル基を有するポリビニリデンフルオロイドである。アミノプロピル基を、カルボニルクロリドとアミノ酸との反応によりDDQガスによって保護した。この反応は当発明によく知られた反応である。これらの基を扭持する表面をドラゴアの溶液に入れ、そして1回の不透明領域及び透明領域のチッカーベー卜バターンを有するマスクに接触させた。マスクを約2.0mm以上の間隔を有する紫外線に3分間、室温にて曝露した。従し、本発明の基層の層において、広範囲の暴露時間及び速度を使用するのが適当である。例えば、1つの層においては、-70度～+50度の工程温度において約1～5000秒の暴露時間用いることができる。

1つの好ましい層において、およそ周辺圧力における約1～500秒間の暴露時間が使用される。幾つかの好ましい層においては、過剰を防止するために周辺より高い圧が用いられる。

次に、膜の表面を約1時間、ランタニドのキレートに結合した活性エスチルを含む亜光基法により洗浄した。当発明は数分間～数時間の広い範囲で異なるであろう。これらの物質は又及び吸可視領域で螢光を発する。フルオロポーラ（fluorophore）中活性エスチルとの反応が完了した後、フルオロポーラが結合した保護基、それを紫外線に曝露し

そして、赤及び緑の螢光を被覆することにより、可視化することができる。塗体の脱塗化された領域はマスクのものとパターンに密接に対応することが観察された。

#### D. シグナル可視化の剖面

シグナル検出の可視化が、フロー・サイトメトリー・スタンドアーダー (Flow Cytometry Standar d) により製造されたモデル No 824 の低レベル標準螢光ビーズキットを用いて試行された。このキットは、既知の数の螢光分子が合体された直径 5.8 μm のビーズを含む。

ビーズの 1 つを、最初にシャッターが閉められたレーザーのフィールド中の図 9 に示すスキャンステージ上の遮蔽フィールド中に置いた。遮蔽フィールド中に置いた後、光子検出装置を作動させた。レーザービームはブロックされず、そして粒子ビームと相互作用し、これは次に螢光を発した。7.000 及び 29.000 のフルオレッセイン分子で合体されたビーズの螢光曲線をそれぞれ図 11A 及び図 11B に示す。各曲線上に、フルオレッセイン分子を伴わないビーズについての追跡輪も示してある。これらの実験は 408 nm の起光、100 フワードのレーザー出力を用いて行われた。光は 40 パワード、7.3 Nm の拡散レンズを通して焦点を結ばせた。

螢光強度はすべての場合に高い値から始まり、そして次に指数的に減少した。強度の低下はフルオレッセイン分子の光滅白 (photobleaching) によるものである。フルオレッセイン分子を伴わないビーズの追跡線はパックグラウンドの差引のために用いられる。選択されたビーズ及び

度を有するスライドは、アミノプロピルトリエトキシシランの濃度が 1.0% ~ 1.0% の間で容易に、再現性よく作ることができ決定された。

#### F. NYOC の除去及び螢光標識の付加

NYOC-GABA を前記のようにして付加した。1 個のスライドの全表面を光に暴露してアーミノ酸の表面の遮蔽アミノ基を露出した。次に、このスライド及び暴露されていない同じものをフルオレッセインイソチオシアヌート (FITC) に曝露した。

図 13A は光に曝露されなかったがしかし FITC に曝露されたスライドを示す。X 軸の単位は時間であり、Y 軸の単位はカウントである。追跡線はある量のパックグラウンド蛍光を含むする。もう一方のスライドを 350 nm のバンド遮蔽に約 1 分間曝露し (12 mW/cm<sup>2</sup>、~350 nm 遮蔽)、洗浄し、そして FITC と反応させた。このスライドの螢光曲線を図 12B に示す。螢光レベルの大きな増加が観察され、これは、先に示したスライドの表面上の多数のアミノ基を螢光マーカーの付加のために露出したことを示している。

#### G. NYOC の除去におけるマスクの使用

次の実験を 0.1% アミノプロピル化スライドを用いて行った。Hg-Xe アーク灯からの光を、レーザー切削したガラス上クロムマスクを通して、基板を直接接触させることにより基板上に形成した。

このスライドを 12 mW の 350 nm のバンド光により約 5 分間曝露し、そして次に 1 mW の FITC 濃度と反応させた。これ

#### 特表平4-505763 (18)

半導体ビーズの間の最初の指標的低下の五を自分して元子カウントの全数を示し、そしてこの数はビーズ当たりの分子の数に因連する。結果、放出され得るフルオレッセイン分子当たり分子の数を推定することができる。図 11 に示す曲線について、この計算が示すところによれば、この計算はフルオレッセイン分子当たり約 4.0 ~ 5.0 回の光子の放射を示す。

#### H. 單位面積当たり分子の数の追定

前記の方法に従って調製されたアミノプロピル化ガラス基板スライドを用いて信頼度の根拠化密度を確立した。スライドの遮蔽アミノ基を、既アミノ基と共有結合を形成する FITC (フルオレッセインイソチオシアヌート) と反応せしめた。次に、スライドをスキャンニングして、フルオレッセイン分子当たり分子の予想値を用いて、単位面積当たり表面の分子の数の計数を可能にする領域中に発生するフルオレッセイン分子の数をカウントする。

その表面にアミノプロピルシランを有するスライドを DMSO/FITC の 1:1 混液にわきよそ周囲温度にて 1 時間すすいだ。反応の後、スライドを DMSO で 3 回、そして次にエタノール、水、そして次に再度エタノールにより洗浄した。次に、それを乾燥し、そしてそれが被覆され得る状態になるまで貯蔵する。

図 11 に示すと同様な曲線を使用し、そして指標的減少シグナルのもとでの螢光カウントを積分することによって、脱塗化後の表面の遮蔽アミノ基の数を決定した。1.0% × 10<sup>3</sup> ~ 約 2 × 2 m<sup>2</sup> 当り 1 フルオレッセインの根拠化密

をレーザー検出スキャンニングステージ上に置き、そして螢光強度のパネル・コードの 2 段表示としてグラフをプロットした。個々のマスクを通して実験を多数回反復した。100 × 100 μm マスク、50 μm マスク、20 μm マスク及び 10 μm マスクの螢光パターンが示すところにみれば、このリソグラフィー技術を用いてマスクパターンは少なくとも約 1.0 μm 以上で区別される。

#### I. YGOF の付加、並びにこれに接着剤による抗体及びナギネマウスへの投産

専定のオリベアド配列に対する受容体が表面結合ペプチドに結合しそして検出されることを確立するため、シリコーンケファリンを表面に結合させ、そして抗体により認識させた。スライドを 0.1% アミノプロピルトリエトキシシランにより洗浄し、そして NYOC により標識した。直角接触印刷 (backside contact printing) を用いて焼却セル中のペプチドを暴露するため 3.0 μm チュッカーボードを用いた。シリコーンケファリン配列 (H-N-テロシン-グリシン-グリシン-フェニルアラニン-ロイシン-COOH、あるいは本明和書において YGOF と称する) をそのカルボキシ末端を介して、スライドの表面に露出されたアミノ基に結合させた。ペプチドを BOP/HOBt/DIPEA カップリング試薬と共に DMSO 混液に加え、そして焼却セルを通して 2 時間、室温にて再結合させた。

ペプチド抗体として知られる第一抗体をスライドの表面に

45分間、2回／回にて、スーパークロクタイル（この場合さしに1%BSA及び1%オバルブミンを含有する）中で透析した。次に、第二抗体、すなわちヤギ抗体マウス・フルオレッセイン複合体を2mg／mlでスーパークロクタイル透析槽中に加え、そして2時間インキュベートした。

この結果を、位置の関係としての蛍光強度としてプロットした。この像を100倍倍率でとり、そして次のことが示された。よく定位されたパターンで抗体が行われるのみならず、（1）この方では基体の表面へのペプチドの結合点のオーバーラップをもたらし、（2）結合したペプチドの表面は抗体との結合のために利用可能であり、そして（3）複合鏡像の能力は受容体の結合を検出するのに十分であった。

#### I. YGGFLのモノマー並列合成及びそれに続く透析抗体への暴露

突起の正方形におけるYGGFL及びGGFLのモノマー並列合成をスライド上チャッカーボードパターン中で行い、そして得られるスライドをHerr抗体に暴露した。この実験を図13A及び図13Bに示す。

図13Aにおいて、この場合はL-BOC（L-アブトキシカルボニル）で保護されているアミノプロピル基により構成されたスライドを示す。スライドをTPAで処理してL-BOC保護基を除去した。次に、そのアミノ基においてL-BOC保護されているE-アミノカブロン酸をアミノプロピル基に連結した。アミノカブロン酸はアミノプロピル基と合成されるべきペプチドとの間のスペーサーとして機能する。

抗体との直接接触（「近接プリント」）において使用された50μmチャッカーボードマスクを用いての成績は、より明瞭なパターンを与える。そしてチャッカーボードパターンの角は、マスクが各体に直接接觸して置かれた結果として感興的であった（これは、この技術を用いての強度の増加を反映している）。

#### J. YGGFL及びPGGFLのモノマー並列合成

図13に示したものに示すように露示する50μmチャッカーボードマスクを用いての成績を行った。しかしながら、追加の透析段階を通して基体上のGGFL部位にPを加えた。保護されたGGFLをマスクを透して先に暴露し、そして次に、前記のようにしてPに暴露することによりPを付加した。従って、基体上の部分はYGGFLを含有し、そして残りの部分はPGGFLを含有した。

この実験についての蛍光プロットが示すところによれば、蛍光はやはり、結合が起った領域と結合が起らなかった領域との間が容易に識別できる。この実験は、抗体が特異的の配列を認識し得ること、及びこの認識が長さ依存的でないことを示した。

#### K. YGGFL及びYPGGFLのモノマー並列合成

本発明の発現可能性をさらに示すため、前記のような技術を用いて基体上に交叉のYGGFL及びYPGGFLの50μmチャッカーボードパターンを合成した。得られる蛍光プロットが示すところによれば、抗体はYGGFL配列を明瞭に認識することができてYPGGFL領域には有意に結合しなかった。

#### 特表平4-505763 (19)

スペーサーのアミノ末端を脱保護し、そしてNVO-C-ロイシンに連結した。次に、スライド全体を12時間の32.5°Cのバンド照明により照明した。次に、スライドをNVO-C-フェニルアラニンと連結しそして洗浄した。スライド全体を再び照明し、そして次にNVO-C-グリシンに連結しそして洗浄した。スライドを再び照明し、そしてNVO-C-グリシンに連結して図13Aの最後の部分に示す配列を形成した。

次に、図13Bに示すように、スライドの突起の領域を500×500μmチャッカーボードマスクを用いる投票プリントを用いて露示し、こうしてグリシンのアミノ基を露示された領域においてのみ露示させた。次の透析化学反応段階を行なうときNVO-C-チロシンを加え、そしてそれを照明を受けた所においてのみ露示させた。次に、スライド全体を照明してすべてのNVO-C基を除去し、照明された領域にYGGPのチロシンチャッカーボードを残し、そして他の領域にGGFLを残した。Herr抗体（これはYGGFLを認識するがしかしSGFLを認識しない）を加え、次にヤギ抗体マウス・フルオレッセイン複合体を加えた。

得られる蛍光スキャンは、Herr抗体より認識されない（そしてそれ故にヤギ抗体マウス抗体・フルオレッセイン複合体との結合が存在しない）チャップテドGGFLを含む領域、及びYGGPとが存在する赤い領域を示した。YGGFLチャップテドはHerr抗体により認識され、そしてそれ故に、照明された領域にはフルオレッセイン-結合ヤギ抗体マウスが認識する抗体が存在する。

#### し. 二段の反復領域の異なるアミノ酸配列の合成及びHerr抗体への組合並列合成の構造

前記の技術に搭載する技術を用いて、一塊の16種類の異なるアミノ酸配列（4連反復）を2枚のガラス基板のそれぞれの上で合成した。スライドの全表面にわたって配列NVO-C-GFLを付加することにより配列を合成した。次に、一塊のマスクを用いて2層のアミノ酸を基板に選択的に適用した。各領域は0.26cm×0.0625cmの寸法を有していた。第一のスライドはL-アミノ酸のみを含むアミノ酸配列を含んでおり、そして第二のスライドは選択されたD-アミノ酸のみを含んだ。図14A及び図14Bはそれぞれ第一スライド及び第二スライド上の種々の領域のマップを示す。図14A及び図14Bに示されるパターンは各スライド上に4連反復させた。次に、スライドをHerr抗体及びフルオレッセイン-結合ヤギ抗体マウスに暴露した。

L-アミノ酸のみを含有する第一スライドの蛍光プロットは赤い領域（強い結合、すなわち149,000カウント以上）、及び黒い領域（Herr抗体がほとんど又は全く結合しない、すなわち20,000カウント以下）を示した。配列YGGFLは明らかに最も強く認識された。配列YAGFL及びYSGFLもまた抗体の強い認識を示した。これに対して、残りの配列のはほとんどが、ほとんど又は全く結合を示さなかった。スライドの4連の反復部分はそこに示される結合の量において非常に一致していた。

L-アミノ酸スライドの蛍光プロットが示すところによれ

は、Y<sub>GG</sub>FL正列により最も強い結合が示された。Y<sub>AG</sub>FL, Y<sub>SG</sub>FL及びY<sub>PG</sub>FLに対しても有意な結合が検出された。残りの配列は抗体との低い結合を示した。配列Y<sub>GG</sub>FLの低い結合効率が検索された。

表6は試験された種々の配列を相対強度の順に示している。これは相対結合親和性に関する情報を提供する。

表 6

## ヒトと A 細胞への見かけ上の結合

レーアミノ酸セット	D-アミノ酸セット
Y <sub>GG</sub> FL	Y <sub>GG</sub> FL
Y <sub>AG</sub> FL	Y <sub>AG</sub> FL
Y <sub>SG</sub> FL	Y <sub>SG</sub> FL
Y <sub>PG</sub> FL	Y <sub>PG</sub> FL
F <sub>GG</sub> FL	F <sub>GG</sub> FL
Y <sub>PG</sub> FL	Y <sub>PG</sub> FL
L <sub>AG</sub> FL	L <sub>AG</sub> FL
F <sub>AG</sub> FL	F <sub>AG</sub> FL
W <sub>GG</sub> FL	W <sub>GG</sub> FL

## IV. 他の構造の例

本発明の他の特徴に従えば、この方法は、表面への囲まれた(caged)結合員の結合を提供し、この結合員はその囲まれた形態において、他の潜在的に結合する種、例えば受

者(cagee)種が不安定化し、これにより活性化された結合員を提供する。典型的なニネルギー頭は光である。

表面の結合員が一旦活性化された後、これらは受容体に付加され得る。選択される受容体はモノクローナル抗体、核酸配列、蛋白質受容体等であることができる。受容体は常にではないが通常、それを直接的又は間接的に結合員に付加する事が可能なよう構造することができる。例えば、結合員に対する強い結合親和性及び受容体又は受容体の結合体(coupling agent)に対する強い親和性を有する典型的な結合物質を用いて、所定により結合員と受容体との間の結合として機能させることができる。この方法は、受容体が特定のリガンドに対するその活性を維持するように調整された受容体を用いる。

好ましくは、固体支撑体に付加された囲まれた結合員は光活性化可能なビオチン結合体、すなわち、アビジン又はアビジン類似体に対して天然ビオチンに比べて布基に低下した結合親和性を有するように光活性化可能な保護基により化学修飾されているビオチン分子であろう。好ましい想様においては、表面の所定の領域に配置された保護基が通常の放射線の適用の際に除去されて結合員をもたらし、この結合員はビオチン、又はアビジンもしくはアビジン類似体に対してビオチンと実質的に同じ結合親和性を有する構造的類似する化合物である。

他の好ましい想様においては、アビジン又はアビジン類似体が表面上の活性化された結合員と共に、数アビジンが結合

特表平4-505763 (20)

固体及び持異的結合基質に対する比較的低い親和性を有する。この他の特徴は、1929年9月8日出願の公報中の出願番号404,920にさらに十分に記載されており、これをすべての目的のため引用により本明細書に組み入れる。

この構造に従えば、本発明は固体支撑体の表面上の所定の領域を修飾する方法を提供し、ここで、所定の領域は受容体を固定化することができる。この方法は、表面に結合された囲まれた結合員を使用し、所定の領域の選択的活性化を可能にする。囲まれた結合員は、所定の領域の選択的活性化の際に活性化されて選択的に受容体と結合することができる結合員として機能する。次に、活性化された結合員を用いて受容体のごとき特定の分子を基体の所定の領域に固定化する。上記の方法を基体上の同一の又は異なる部位において反復し、例えば同一の又は異なる受容体を有する表面上の複数の領域を有する表面を得る。こうして固定化された受容体が又は複数のリガンドについて異なる親和性を有する場合、そのリガンドについてのスクリーニング及び選択を前記受容体を含むする表面の接着において行うことができる。

他の特徴も基体に付加された軽量な囲まれた結合員を用いることができる。囲まれた(不活性化された)構成員は、活性化された結合員の対する親和性と比較した場合、囲まれていない結合員に特異的に結合する物質の受容体に対する比較的低い親和性を有する。従って、活性化されるべき表面の構造に適当なエネルギー源が適用されるまで、結合員は反応から保護される。適当なエネルギー源の適用の際、囲んでい

る間に強く結合するまでインキュベートする。次に、表面の所定の領域上に固定化されたアビジンを所定の受容体又は所定の受容体の結合体と共にインキュベートすることができる。アビジンが表面の所定の領域上に固定化される場合、受容体は好ましくはビオチン化され、例えばビオチン化抗体であろう。あるいは、好ましい想様は、あらかじめ調整されたアビジン/ビオチン化受容体複合体は、表面の活性化された結合員に与える。

## V. 技術

本発明は、基体上でポリマーを合成するための非常に改良された方法及び装置に関する。前記の記載は説明的なものであって制限的なものではないことが意図される。前記の記載を踏襲した後、当業者には多くの想様が自明であろう。例として、本発明は主として光活性可能な保護基の使用に旨として記載されているが、光以外の他の放射線を使用し得ることが当業者に容易に実現されるであろう。例えば、数つかの想様において、電子ビーム照射、X-線照射(電子ビームリソングラフィーとの組合せにおける)、又はX-線リソグラフィー技術に対して選択的である保護基を用いるのが好ましいであろう。あるいは、電流への暴露により基を除去することができる。従って本発明の範囲は、前記の記載によって決定されるべきではなく、添付された請求の範囲及び該請求の範囲に均等な全範囲に関して決定されるべきである。

特典手4-505763(21)

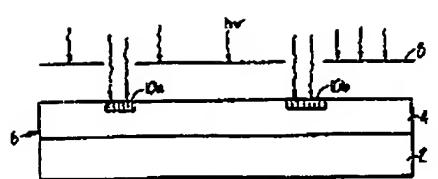


FIG. 1.

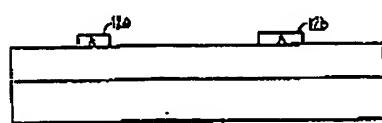


FIG. 2.

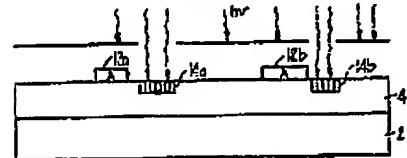


FIG.—3

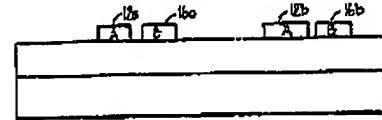
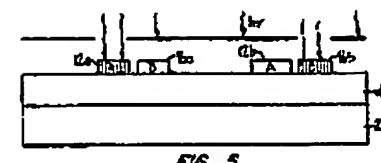


FIG. 4.



F76-5

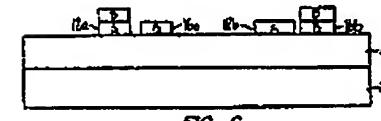


FIG. 6

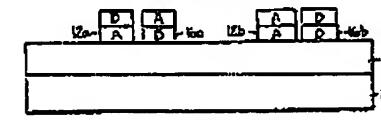
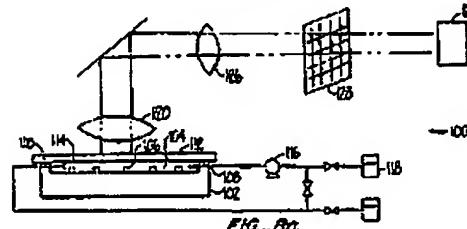


FIG. 7



### Figure

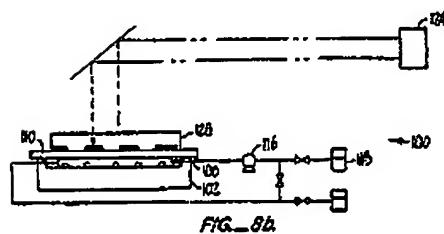


FIG. 84

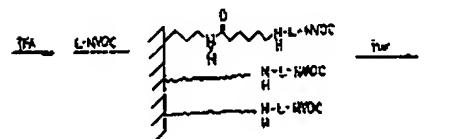
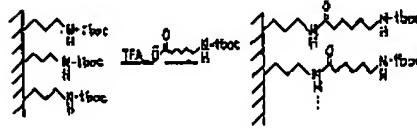
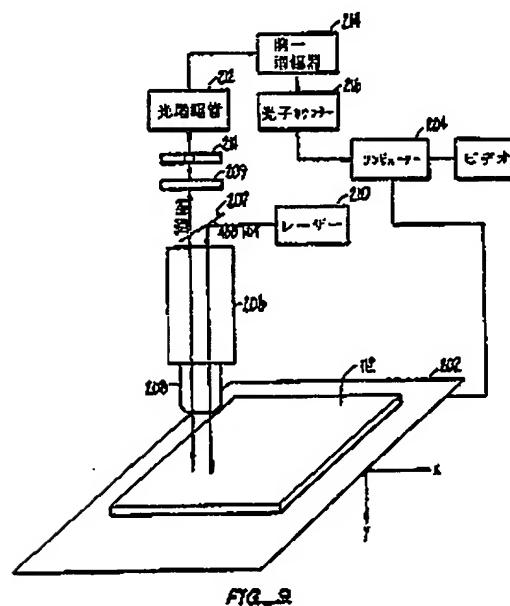
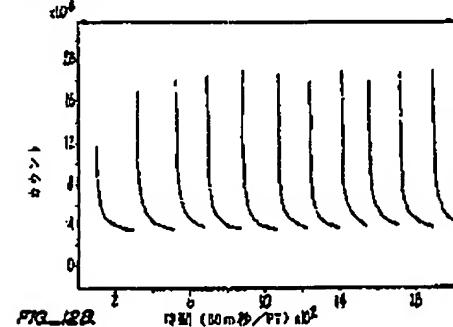
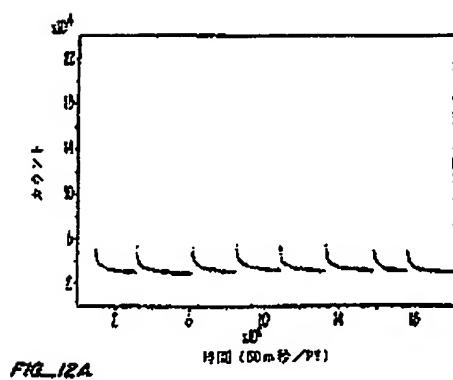
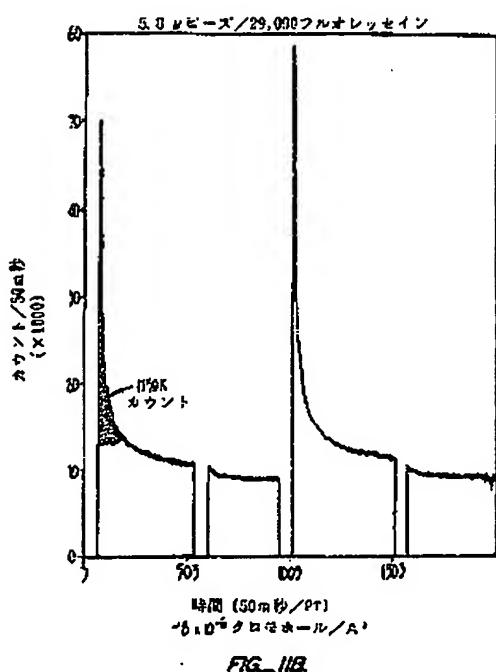
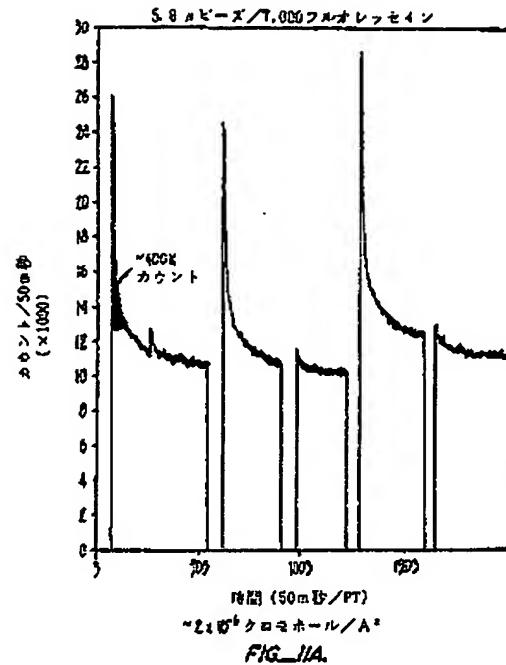
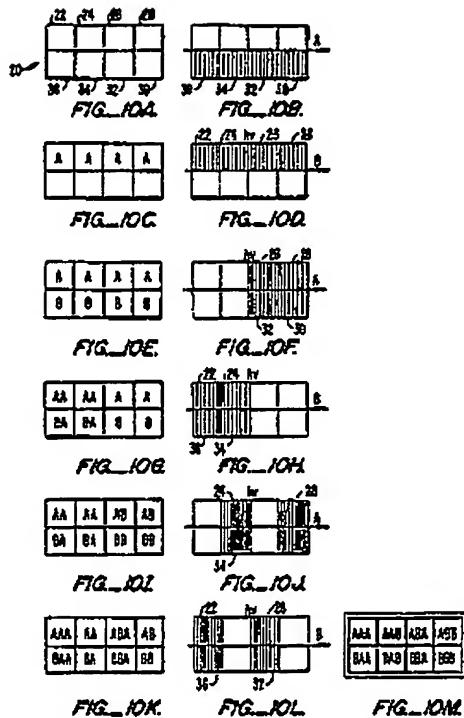


FIG. 130.



### FIG. 9

特表平4-505763 (22)



特許4-505763 (23)

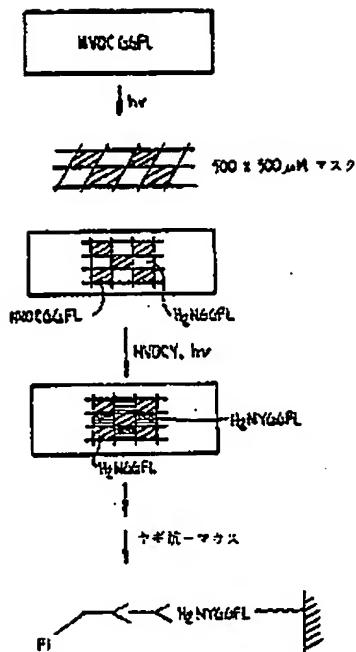


FIG-13B

P	A	S	G	L
<u>P</u> FL	<u>A</u> FL	<u>S</u> FL	<u>G</u> FL	L
<u>F</u> FL	<u>A</u> FL	<u>S</u> FL	<u>G</u> FL	F
<u>W</u> FL	<u>W</u> FL	<u>W</u> FL	<u>W</u> FL	W
<u>Y</u> FL	<u>Y</u> FL	<u>Y</u> FL	<u>Y</u> FL	Y

FIG-14A

P	A	S	G	Y
<u>Y</u> FL	<u>Y</u> FL	<u>Y</u> FL	<u>Y</u> FL	Y
<u>F</u> FL	<u>F</u> FL	<u>F</u> FL	<u>F</u> FL	F
<u>W</u> FL	<u>W</u> FL	<u>W</u> FL	<u>W</u> FL	W
<u>Y</u> FL	<u>Y</u> FL	<u>Y</u> FL	<u>Y</u> FL	Y

FIG-14B

特許登録出願書  
(特許法第14条の8)

平成3年12月7日

特許庁長官 面会 豊原

1 特許出願の要項  
PCT/NL96/000012 発明の名称  
非常に大規模な固定化ペプチド合体  
3 特許出願人住所 オランダヘンティル、キュラソー  
ダ・リュイデルカデ 62  
名前 アフィマックス テクノロジーズ  
ヌームロゼ ベノートスハップ4 代理人  
住所 東京都渋谷区渋谷ノ門一丁目8番10号渋谷光ノ門ビル  
〒105 電話 (03)6721  
氏名 井程士 (2579) 青木 順  
(弁士)5 登記書の提出期日  
1997年7月21日6 登録審査の自体  
特許登録出願書

3.4 本発明

1. 第一の発明表面の知られた場所で種々の化学配列を

配置する方法であって、

(a) 基体の選択された領域をアクチベーターに暴露する

ことにより保護基を除する；

(b) 組合可能な保護基を有するモノマーに初期領域を暴

露する；

(c) 階段 (a) 及び (b) を反復し、ここで前記選択さ

れた領域が同一の又は異なる領域であり、そして前記モノマー

が同一の又は異なるモノマーであって前記基体上で種々の配列

を含むで成る方法。

第四輯 異議

筹表平4-505763 (24)

自序

HL 900001

This comes from the general liability insurance held by the property management firm to the individual landlord for such losses. The amounts are as reported in the *Europcar Annual C.P.R.* for 1988 (p. 152-153).

Opmaatwaarde staat in voorbereiding	Uitvoerders naam	3 maanden voordien	Pub. datum vandaag
CP-A- Q3282D6	36-08-09	37-A- 3032750	16-08-79

特表平4-505763 (25)

## 第1頁の続き

④Int. Cl. 3	差別記号	序内整理番号
G 01 N 33/533	U	8810-2J
33/538		8810-2J
33/541		8810-2J
I C 07 K 7/08	Z	8818-4H
C 07 K 88/00		

優先権主張 ④1990年3月7日米国(US)④492,462  
 ④発明者 リード, ジエイ. レイトン アメリカ合衆国, カリフォルニア 94301, パロ アルト, ラミナ  
 100J  
 ④発明者 フオドア, スティーブン ビ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94303, パロ アルト, ウイン  
 ターフリーン ウエイ 817  
 ④発明者 ストライア, ルパート アメリカ合衆国, カリフォルニア 94305, スタンフォード, ソノ  
 マ テラス 843

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

**BLACK BORDERS**

**IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

**FADED TEXT OR DRAWING**

**BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

**SKEWED/SLANTED IMAGES**

**COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

**GRAY SCALE DOCUMENTS**

**LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

**REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

**OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**